

**El género *Profundulus* Hubbs, 1927
(Actinopterygii: Profundulidae):
Sistemática, filogenia y biogeografía**

Madrid, 2004

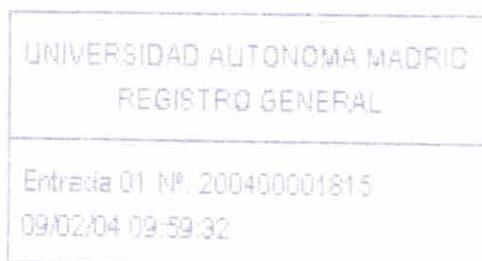
30 cm

a635574

C/2699

El género *Profundulus* Hubbs, 1924 (Actinopterygii: Profundulidae): Sistemática, filogenia y biogeografía

Memoria presentada por
Felipe Morcillo Alonso para optar al grado de Doctor en Ciencias



Director de Tesis:
Dr. Ignacio Doadrio Villarejo
Investigador científico

Tutor de Tesis:
Dr. Carlos Montes del Olmo
Catedrático de Ecología



Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid.
Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva.

Universidad Autónoma de Madrid.
Facultad de Ciencias.
Departamento de Ecología.

Rg. F. C. 33863





Profundulus punctatus

A Nico y Angelita, mis padres

A Robert Rush Miller (1916-2003)

Índice

	Págs.
1. Introducción.....	1
1.1. Los Ciprinodontiformes.....	1
1.2. La familia Profundulidae Hoedeman y Bronner, 1951.....	4
1.2.1. El subgénero <i>Profundulus</i> Hubbs, 1924.....	5
1.2.1.1. <i>Profundulus punctatus</i> (Günther, 1866).....	5
1.2.1.2. <i>Profundulus guatemalensis</i> (Günther, 1866).....	6
1.2.2. El subgénero <i>Tlaloc</i> Álvarez y Carranza, 1951.....	7
1.2.2.1. <i>Profundulus labialis</i> (Günther, 1866).....	7
1.2.2.2. <i>Profundulus candalarius</i> Hubbs, 1924.....	8
1.2.2.3. <i>Profundulus hildebrandi</i> Miller, 1950.....	8
1.3. Biogeografía de la familia Profundulidae.....	9
2. Justificación del estudio.....	11
2.1. Hipótesis.....	11
2.2. Hipótesis sobre taxonomía: el concepto de especie.....	11
2.3. Objetivos.....	13
3. Material y métodos.....	15
3.1. Área de estudio.....	15
3.2. Material.....	15
3.3. Métodos.....	20
3.3.1. El método de captura de ejemplares.....	20
3.3.2. Los métodos moleculares.....	20
3.3.2.1. La electroforesis de proteínas.....	21
3.3.2.2. La secuenciación del ADN mitocondrial.....	26
3.3.3. Aproximación microevolutiva.....	31
3.3.3.1. La variabilidad genética nuclear.....	31
3.3.3.2. El flujo genético.....	32
3.3.3.3. La variabilidad genética mitocondrial.....	34
3.3.3.4. Las distancias genéticas.....	34
3.3.4. Aproximación macroevolutiva.....	37
3.3.4.1. Métodos basados en distancias.....	38
3.3.4.2. Métodos basados en caracteres.....	40
3.3.4.2.1. Método de máxima verosimilitud.....	41
3.3.4.2.2. Inferencia bayesiana.....	42
3.3.4.2.3. Métodos de máxima parsimonia.....	43
3.3.4.2.4. Comparación y efectividad de los diferentes métodos.....	46
3.3.5. El reloj molecular.....	48
3.3.6. Biogeografía.....	51
4. Resultados.....	58
4.1. Descripción de zimogramas.....	58
4.1.1. AAT (Aspartato-aminotransferasa. N° C.E. 2.6.1.1).....	58
4.1.2. AK (Adenilato-quinasa. N° C.E. 2.7.4.3).....	61
4.1.3. CK (Creatina-quinasa. N° C.E. 2.7.3.2).....	62
4.1.4. EST (Carboxilesterasa. N° C.E. 3.1.1.1).....	63
4.1.5. FUM (Fumarato hidratasa. N° C.E. 4.2.1.2).....	65
4.1.6. IDH (Isocitrato deshidrogenasa NADP+ dependiente. N° C.E. 1.1.1.42).....	66
4.1.7. LDH (L-Lactato deshidrogenasa. N° C.E. 1.1.1.27).....	68
4.1.8. MDH (Malato deshidrogenasa. N° C.E. 1.1.1.37).....	70

4.1.9. ME (Malato deshidrogenasa NADP+ dependiente. N°.C.E. 1.1.1.40).....	71
4.1.10. PMI (Manosa-6-fosfato isomerasa. N°.C.E. 5.3.1.8).....	73
4.1.11. PGI (Glucosa-6-fosfo isomerasa N°.C.E. 5.3.1.9).....	74
4.1.12. PGM (Fosfogluco-mutasa. N°.C.E. 5.4.2.2).....	76
4.1.13. 6PGD (Fosfogluconato deshidrogenasa. N°.C.E. 1.1.1.44).....	77
4.1.14. SOD (Superóxido-dismutasa, N°.C.E. 1.15.1.1).....	78
4.2. Caracterización de las poblaciones a partir de datos aloenzimáticos.....	79
4.3. Caracterización de los individuos de las poblaciones a partir de datos de secuencias que codifican para las ATPasas 6 y 8.....	81
4.4. La variabilidad genética nuclear.....	84
4.5. F de Wright.....	87
4.6. Las distancias genéticas.....	89
4.7. Aproximación macroevolutiva.....	93
4.7.1. Métodos basados en distancias.....	93
4.7.2. Métodos basados en caracteres.....	97
4.7.2.1. Método de máxima verosimilitud.....	97
4.7.2.2. Inferencia bayesiana.....	100
4.7.2.3. Métodos de máxima parsimonia.....	100
4.8. El reloj molecular.....	107
4.9. Biogeografía.....	108
5. Discusión.....	110
5.1. Aproximación microevolutiva.....	110
5.1.1. La variabilidad genética nuclear.....	110
5.1.2. La variabilidad genética mitocondrial.....	117
5.1.3. Resolviendo las hipótesis de variabilidad.....	118
5.1.4. El flujo genético.....	118
5.1.5. Las distancias genéticas.....	120
5.2. Aproximación macroevolutiva.....	124
5.3. Resolviendo hipótesis sobre la posición taxonómica y filogenia.....	125
5.4. El reloj molecular.....	129
5.5. Resolviendo hipótesis sobre biogeografía.....	131
5.6. Propuestas de conservación.....	131
6. Conclusiones.....	134
7. Bibliografía.....	139
8. Anexos	
8.1. Anexo 1: Frecuencias alélicas de las poblaciones de <i>Profundulus</i>	163
8.2. Anexo 2: Alelos marcadores, exclusivos y raros en las poblaciones de <i>Profundulus</i>	169
8.3. Anexo 3: Secuencias de los genes de los individuos analizados de <i>Profundulus</i> que codifican para las ATPasas 6 y 8.....	187
8.4. Anexo 4: Distancias de Nei (1972).....	192
8.5. Anexo 5: Distancias de Rogers (1972).....	193
8.6. Anexo 6: Distancias de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967).....	194
8.7. Anexo 7: Distancias absolutas.....	195
8.8. Anexo 8: Distancias no corregidas.....	196
8.9. Anexo 9: Resultados obtenidos de la aplicación del programa DIVA.....	197

1. Introducción

La ictiofauna continental centroamericana se caracteriza por su gran diversidad en peces dulceacuícolas de origen marino, incluidos en lo que ha venido a denominarse peces secundarios (Myers, 1938). Desde el Istmo de Tehuantepec en México hasta el Chocó colombiano, los peces secundarios comprenden alrededor del 74% de los peces de agua dulce conocidos. Dentro de éstos, los más diversificados son los cíclidos con 82 especies repartidas en 6 géneros y los ciprinodontiformes con 84 especies repartidas en 23 géneros. Algunos autores han asignado una mayor antigüedad en Centroamérica a los ciprinodontiformes que podrían tener su origen a principios del Terciario, mientras que los cíclidos aparecerían a finales del mismo o comienzos del Cuaternario (Briggs, 1984). Esta teoría está basada en la mayor diversidad a nivel de género en los ciprinodontiformes, aunque entra en contradicción con la presencia de *Cichlasoma woodringi* en el registro fósil del Mioceno Medio en la isla de La Española (Rivas, 1986).

1.1. Los Ciprinodontiformes

Los ciprinodontiformes constituyen un grupo bastante diverso, con alrededor de 900 especies en aproximadamente 115 géneros. En este grupo hay especies que toleran un amplio rango de temperaturas y diferentes regímenes de salinidad, desde aguas dulces a salobres. Su pequeño tamaño permite la existencia de poblaciones viables en hábitats restringidos (Parker y Kornfield, 1995). Algunas especies son muy utilizadas en trabajos experimentales debido a que se adaptan fácilmente a las condiciones de laboratorio. Por ello, han sido muy útiles en el campo de la embriología, genética, fisiología, endocrinología, citología y comportamiento. Determinados ciprinodontiformes, especialmente diferentes especies del género *Gambusia*, han sido empleados en todo el mundo para controlar diversas enfermedades como el paludismo, transmitido por mosquitos, debido a su apetencia hacia las larvas acuáticas de este insecto y a una alta tasa de reproducción y adaptación a muy diferentes ambientes. Además, son muy apreciados en acuariofilia. Desde un punto de vista evolutivo, los ciprinodontiformes constituyen un grupo de particular interés, debido a su amplia distribución, a su diversidad cariotípica, a las numerosas especializaciones morfológicas y a que presentan un repertorio de adaptaciones reproductivas sin precedentes (partenogénesis, hibridogénesis, anualismo y ovoviviparidad) (Parker y Kornfield, 1995; Murphy y Collier, 1996).

Tradicionalmente los ciprinodontiformes, superfamilia Cyprinodontoidea, orden Atheriniformes (Rosen, 1964), han incluido cinco familias: los ovíparos (Cyprinodontidae) que se extienden por el Viejo y el Nuevo Mundo, y las familias vivíparas del Nuevo Mundo: Poeciliidae, Jenynsiidae, Anablepidae y Goodeidae. Parenti (1981) estudió la filogenia y distribución de este grupo y propuso una nueva clasificación donde la superfamilia Cyprinodontoidea es elevada a la categoría de orden y es dividida en dos subórdenes: Aplocheiloidei y Cyprinodontoidei. El primero incluye once géneros distribuidos por el Nuevo Mundo (esencialmente confinados al Neotrópico y las Antillas) y cinco géneros en el Viejo Mundo (en el África tropical, Madagascar y sureste Asiático). El suborden Cyprinodontoidei incluye las especies vivíparas del Nuevo Mundo y numerosos géneros ovíparos en el Viejo y en

el Nuevo Mundo (Briggs, 1986), entre ellos el género objeto de este estudio, el género *Profundulus*.

En este trabajo se ha seguido la clasificación de Parenti (1981), generalmente aceptada a pesar de las críticas realizadas en las últimas décadas, como la recibida por el emplazamiento de las formas basales de la filogenia propuesta para los ciprinodóntidos americanos (Huber, 1996). Hasta el momento, únicamente Eschmeyer (1990), en su lista de géneros de especies de peces actuales, ha propuesto una nueva clasificación general de Cyprinodontiformes, basada en una síntesis personal de las publicaciones realizadas por otros autores.

La mayor diversidad de los ciprinodontiformes ovíparos se encuentra en el sur de Norteamérica. Entre los grupos vivíparos (los cuales se consideran más derivados), los más extendidos son los poecílidos; hay una elevada diversidad de especies en Centroamérica, el área donde aparentemente se originaron (Rosen y Bailey, 1963). Los goodeidos están confinados a las tierras altas de la Meseta Central de México y a la cuenca oeste de los Estados Unidos. Los anablépidos se encuentran en el norte y centro de Suramérica. Los jenínidos están confinados a la parte meridional de Suramérica.

Los ciprinodontiformes se distribuyen actualmente en climas tropicales y templados, su distribución coincide con la existencia del antiguo supercontinente Pangea y están ausentes al este de la línea de Wallace, línea clásica de demarcación de la región Indo-Australiana (Parenti, 1981). El origen de los ciprinodontiformes se sitúa a finales del Triásico, cuando comenzó la separación de Laurasia y Gondwana (Parenti, 1981). Esta hipótesis los situaría en una fauna pre-teleostea. Otros autores sugieren un origen posterior, quizás Cretácico, cuando Suramérica y África acabaron de separarse dejando un estrecho paso de agua salada entre los dos continentes (Briggs, 1986). Aunque el fósil ciprinodontiforme más antiguo descrito, *Prolebias*, del Oligoceno, es europeo (Gaudant 1981, 1989), los estudios de filogenia, la distribución geográfica y la notable riqueza y especialización de los ciprinodontiformes, parecen indicar que las líneas evolutivas más primitivas se encuentran en el sur de Norteamérica, Centroamérica y Suramérica (Briggs, 1986), siendo la subfamilia Rivulinae, dentro de los aplocheiloideos, el grupo más primitivo de todos los ciprinodontiformes (Parenti, 1981). Bussing (1998) atribuye la distribución actual de los peces continentales de Centroamérica a tres sucesos migratorios diferentes: (1) una primera radiación en Centroamérica a finales del Cretácico desde Suramérica, (2) una invasión más reciente, también desde Suramérica, al formarse el Istmo de Panamá (hace tres millones de años), y (3) una radiación procedente del norte que no contiene ningún miembro ciprinodontiforme. Bermingham y Martín (1998) difieren de Bussing en la fecha de la primera invasión de los peces primarios, situándola más recientemente, en el Mioceno.

El género del suborden Cyprinodontoidei más relacionado con Aplocheiloidei, y por lo tanto el más primitivo, es *Profundulus* Hubbs, 1924; la presencia de numerosos caracteres plesiomórficos parece confirmar su antiguo origen. Algunos autores, basándose en caracteres morfológicos han postulado un origen muy antiguo para la familia Profundulidae (Miller, 1955) situándola filogenéticamente basal al suborden Cyprinodontoidei (Parenti, 1981; Wiley, 1986).

Sin embargo, estudios moleculares posteriores no admiten esta posición basal de la familia Profundulidae, considerando que es el grupo hermano de la familia Goodeidae (Meyer y Lydeard, 1993): una familia endémica de México Central y del sur de los Estados Unidos en la que la mayoría de las especies ha adquirido, como estrategia reproductiva, el viviparismo. Parker (1997) encuentra incongruencias entre las filogenias elaboradas a partir de datos moleculares y morfológicos en lo que se refiere a la posición de *P. guatemalensis* en relación a otras especies de Cyprinodontidae; así, los caracteres morfológicos lo sitúan en una posición basal en la línea de los cyprinodontídeos, mientras que los datos moleculares lo sitúan como grupo hermano de especies de la familia Goodeidae. Un análisis de los datos combinados colocan a *P. guatemalensis* en una tricotomía no resuelta junto a *F. heteroclitus* y las especies de la familia Goodeidae.

El género *Profundulus* es endémico de Centroamérica y habita en arroyos de montaña entre unos 90 y 2100 m de altura. En altitudes muy elevadas constituyen los únicos peces autóctonos existentes en Centroamérica. Vive exclusivamente en agua dulce y por lo tanto, su dispersión debe haber ocurrido a través de aguas continentales, contrastando con el resto de los ciprinodontiformes y ciclidos, los cuales toleran amplias fluctuaciones en salinidad y por lo tanto pueden haber usado el mar como ruta de dispersión (Miller, 1955).

La familia Profundulidae parece ser originaria de Centroamérica, su origen se remontaría al menos al Plioceno, y probablemente al Mioceno (Miller, 1955). En contraste a su antiguo origen, la familia Profundulidae presenta actualmente una distribución restringida a un pequeño área de las vertientes atlántica y pacífica del Norte de Centroamérica. En la vertiente pacífica está ampliamente distribuida desde la cuenca del río Balsas en México al río Lempa en Honduras (Miller, 1955). En la vertiente atlántica está aún más restringida: se distribuye desde la cuenca del río Papaloapan en México (Doadrio, observaciones personales) hasta la cuenca del Motagua en Guatemala (Miller, 1955).

La familia Profundulidae consta de un sólo género nominal, el género *Profundulus* Hubbs, 1924, dividido en dos subgéneros: el subgénero *Profundulus* Hubbs, 1924 con 6 especies descritas, *P. punctatus* (Günther, 1866), *P. guatemalensis* (Günther, 1866), *P. pachycephalus* (Günther, 1866), *P. oaxacae* (Meek, 1902), *P. balsanus* Ahl, 1935 y *P. scapularis* Fowler, 1936; y el subgénero *Tlaloc* Álvarez y Carranza, 1951 con 4 especies, *P. mexicanus* Álvarez y Carranza, 1951, *P. labialis* (Günther, 1866), *P. candalaria* Hubbs, 1924 y *P. hildebrandi* Miller, 1950.

El origen de estos dos subgéneros está asociado a la compleja historia geológica y diversidad ecológica del sur de México y norte de Centroamérica. Tres de las especies, *P. punctatus*, *P. guatemalensis* y *P. labialis* muestran una variación intraespecífica considerable, en cuanto a caracteres morfológicos se refiere. Esta plasticidad fenotípica puede ser una respuesta a variaciones medioambientales (Miller, 1955). Para saber si esta variabilidad tiene bases genéticas es necesario información a nivel molecular. Los resultados de este estudio son imprescindibles para comprender la diversidad real y las relaciones evolutivas de la familia Profundulidae, las cuales no se conocen (Burr y Mayden, 1992). Esta información puede

proporcionarla el estudio de alozimas y la secuenciación de ADN. Igualmente estos datos contribuirán al conocimiento de las relaciones evolutivas y al conocimiento de la biogeografía de la zona al poderse contrastar hipótesis geológicas del área.

A continuación y para una mayor comprensión de la problemática se realiza una breve revisión histórica a nivel sistemático y evolutivo de la familia Profundulidae.

1.2. La familia Profundulidae Hoedeman y Bronner, 1951

La familia Profundulidae consta de un género nominal, *Profundulus* Hubbs, 1924, que a su vez se divide en dos subgéneros: *Profundulus* Hubbs, 1924 y *Tlaloc* Álvarez y Carranza, 1951, cuyas diferencias en cuanto a caracteres morfológicos y merísticos aparecen en la tabla 1. Etimológicamente, hace referencia a su presumible relación con el género *Fundulus*.

En cuanto a la posición taxonómica, Garman (1895) sinonimizó todas las especies conocidas de *Profundulus* con *Fundulus parvipinnis* Girard, 1854. Sin embargo, las especies que se consideran actualmente dentro del género *Profundulus* fueron incluidas en los géneros *Fundulus* (familia Fundulidae), *Adinia* (familia Fundulidae) y *Zoogoneticus* (familia Goodeidae) (Hubbs, 1924; Hubbs y Turner, 1939). Myers (1931) situó a *Profundulus* en la familia Cyprinodontidae y en la tribu Fundulini. Álvarez y Carranza (1951) describieron el género *Tlaloc*, actualmente considerado sinónimo de *Profundulus* (Huber, 1996), y lo incluyeron en la tribu Rivulini (Cyprinodontidae). Hoedeman y Bronner (1951) construyeron la tribu Profundulidi para incluir los géneros del Viejo Mundo *Kosswigichthys* y *Valencia* y los Americanos *Profundulus* y *Adinia*. Esta tribu no fue considerada por Miller (1955), ya que fusionaba Cyprinodontinae y Fundulinae. Sethi (1969) elevó la subfamilia Fundulinae a la categoría de familia. Farris (1968) separa las especies de *Fundulus* y de *Profundulus* por la presencia en el cráneo de éste último de un proceso lateral en la superficie anterior del etmoides lateral. Finalmente, el género *Profundulus* fue incluido en la familia Profundulidae (Parenti, 1981) de la que es su único representante. Cabe señalar que en su clasificación Eschmeyer (1990) lo sitúa al nivel de subfamilia, Profundulinae, incluyéndolo dentro de la familia Cyprinodontidae.

La familia Profundulidae se caracteriza por tener un elevado número de branquiespinas en el primer arco branquial. El número oscila entre 14 y 23 (siendo la moda 16). Este carácter es considerado único en el suborden de los ciprinodontóideos y, por lo tanto, se considera un carácter derivado del género. Una autapomorfia adicional es la presencia de una fosa autopterótica relativamente grande (Parenti, 1981).

Caracter	Subgénero <i>Profundulus</i> (<i>P. punctatus</i> , <i>P. guatemalensis</i>)	Subgénero <i>Tlaloc</i> (<i>P. labialis</i> , <i>P. candalarius</i> , <i>P. hildebrandi</i>)
Preorbital	Con escamas, ancho	Normalmente desnudo o con 1 o 2 escamas, estrecho
Coloración del adulto	Oscura, a menudo con una banda lateral y con reticulaciones en los costados en forma de cadena, o con abundantes puntos negros en filas longitudinales a lo largo de los costados hasta la aleta caudal; un punto negro en la región humeral.	Clara, sin una banda lateral definida pero con marcas claras interrumpidas y puntos claros en los costados. Sin punto humeral
Aleta caudal	Al menos hasta la mitad cubierta con numerosas escamas	Menos de la mitad cubierta con numerosas escamas
Escamas dorsolaterales	5	En <i>P. labialis</i> predominantemente 6, raramente 5, en ocasiones 7. En <i>P. candalarius</i> y <i>P. hildebrandi</i> 5
Escamas en la serie lateral	Normalmente 32-34 (31-35, 36 en 1 ejemplar)	Normalmente 35 -38 (34 -39), excepto <i>P. candalarius</i> , 34 (33 -36)
Vertebras	32 a 34, raramente 31 o 35 (36 en uno)	35 a 39, normalmente de 36 a 38 (33 a 37 en <i>P. candalarius</i> y <i>P. hildebrandi</i>)
Mandíbula inferior	Ancha, fuerte y sobresale tanto que incluye la mandíbula superior	Igual que la mandíbula superior e igual en proyección o incluida en la superior (excepto <i>P. hildebrandi</i> que se parece a <i>P. guatemalensis</i>)
Aleta anal de la hembra adulta	Sólo moderadamente alargada, los radios anteriores no mucho más largos que los posteriores	Alargada (salvo <i>P. candalarius</i>), los radios anteriores más largos que los posteriores
Origen de la dorsal	Por encima o por delante del origen de la anal	Ligeramente o claramente detrás del origen de la anal
Rostral de adultos	No desarrollado.	Normalmente desarrollado, al menos en parte.

Tabla 1: Comparación entre los dos subgéneros de *Profundulus*, *sensu* Miller (1955).

1.2.1. El subgénero *Profundulus* Hubbs, 1924

Actualmente se reconocen en este subgénero dos especies *Profundulus punctatus* (Günther, 1866) y *Profundulus guatemalensis* (Günther, 1866).

1.2.1.1. *Profundulus punctatus* (Günther, 1866)

Profundulus punctatus fue descrita con un ejemplar capturado en Chiapam, en la costa pacífica de Guatemala. Günther (1866) describió esta localidad como una laguna costera cerca de la desembocadura de un río estacional, con agua más o menos salada y, en su mapa, la situó cercana al actual puerto de Champerico. Miller (1955) opina que si el ejemplar realmente

corresponde a Chiapam, debió haber llegado por escorrentía durante una gran inundación, ya que no capturó ningún *P. punctatus* a menos de 25 km de la costa o a menos de 90 m sobre el nivel de mar. El hábitat descrito en Chiapam es el más atípico para *Profundulus* (Miller 1955).

Según Miller (1955), *P. punctatus* está confinado en Guatemala a las llanuras de la costa pacífica y a las pendientes más externas de la Cordillera, generalmente al oeste de *P. guatemalensis*, ya que no viven en simpatria y normalmente por debajo de los 1200 m. En la vertiente pacífica se extiende desde la cuenca del Balsas en Oaxaca, sur de México, hasta la vecindad de Chiquimulilla, Departamento de Santa Rosa, sur de Guatemala. En la costa atlántica, Miller (1955) lo sitúa desde la cuenca del Coatzacoalcos (aunque en este estudio se amplia su límite de distribución desde la cuenca del Papaloapan), Oaxaca (México), hasta la cuenca del río Grijalva-Usumacinta, Chiapas (México). De todas las especies de la familia ésta es la que tiene un mayor área de distribución.

Profundulus punctatus se caracteriza porque el cuerpo de los adultos tiene numerosos puntos marrones en las escamas, conspicuos y alineados formando filas longitudinales a lo largo de los costados, desde las aletas pélvicas hasta la aleta caudal; la cabeza es cónica; y la superficie dorsal cóncava o casi plana.

Miller (1955) consideró como sinónimas de *P. punctatus* a *P. pachycephalus* (Günther, 1866) descrita en el lago Atitlán (Guatemala) pero aparentemente extinguida, a *P. oaxacae* (Meek, 1902) descrita en el río Verde (Oaxaca, México), a *P. balsanus* Ahl 1935 descrita en el río Balsas, Malinaltepec (Guerrero, México) y a *P. scapularis* Fowler, 1936 descrita en el río Bravo, Finca Mocá (Guatemala).

1.2.1.2. *Profundulus guatemalensis* (Günther, 1866)

Profundulus guatemalensis fue descrita en cuatro localidades: Ecuador, Lago Atitlán, Lago Dueñas y río Guacalate. Miller (1955) designó como lectotipos los ejemplares del río Guacalate, ya que las otras tres localidades podrían ser erróneas y en ellas puede que nunca haya existido *P. guatemalensis*. La localidad tipo debe ser, por tanto, el río Guacalate, vertiente pacífica, en las tierras altas cerca de la Ciudad de Guatemala, probablemente cerca de Dueñas, a unos 8 km al sudoeste de Antigua. En la actualidad esta localidad se encuentra muy deteriorada por el empleo de insecticidas y utilización de agua para cultivos de frambuesas.

Según Miller (1955) la distribución de *P. guatemalensis* está restringida a las tierras altas de Guatemala, donde se encuentra normalmente en elevaciones entre 800 y 1500 m de altura. En la cuenca del Motagua (cuenca atlántica) fue capturado al oeste de El Rancho a una altitud de aproximadamente 600 m y fue encontrado a 530 m en el río Michatoya al norte de Escuintla, en la vertiente pacífica. Ningún individuo fue capturado por encima de los 1900 m de altura. El rango de distribución de esta especie, aunque incluye ambas vertientes, atlántica y pacífica, está más restringido que *P. punctatus* y *P. labialis*, como se verá más adelante. Se da en arroyos de la vertiente pacífica, en los tramos superiores (en tierras altas) del río Guacalate y su tributario

del oeste, el Achiguate, Guatemala, hasta los tributarios del río Lempa (también de tierras altas) al este del Departamento de Intibucá, Honduras. La especie no se conoce en las llanuras de la costa del Pacífico, pero está presente en el piedemonte en las cuencas del río Michatoya y el río Guacalate y, presumiblemente en el río de los Esclavos, Guatemala. En la cuenca atlántica Miller (1955) capturó esta especie solamente en Guatemala: en el tramo superior del río Motagua y en tres tributarios del río Negro (río Rabinal, río San Jerónimo y río Carchelá), en la cuenca del Grijalva-Usumacinta. Para el presente estudio se han recolectado ejemplares en el río Cahabón, afluente del tramo alto del río Polochic (Guatemala).

Esta especie se caracteriza porque su cuerpo, en todas las edades, carece de manchas marrones a lo largo de la fila de escamas; su cabeza típicamente es rectangular y más abovedada, la superficie dorsal generalmente es muy redondeada.

La variación de esta especie no es tan marcada como en *P. punctatus* y *P. labialis*, quizás porque presenta una menor área de distribución que las anteriores y por lo tanto soporta factores ambientales menos contrastados.

1.2.2. El subgénero *Tlaloc* Álvarez y Carranza, 1951

Dentro de este subgénero se admiten tres especies: *P. labialis* (Günther, 1866), *P. candalarius* Hubbs, 1924 y *P. hildebrandi* Miller, 1950.

1.2.2.1. *Profundulus labialis* (Günther, 1866)

La descripción original de *P. labialis* (Günther, 1866) está basada en especímenes del río Negro o Chixoy, del río San Jerónimo y del Lago Izabal (Günther, 1886). Debido a la vaguedad de la localidad río Chixoy y la ausencia de *Profundulus* en el Lago Izabal, la localidad tipo queda restringida al río San Jerónimo en San Jerónimo, cuenca del Grijalva-Usumacinta (Guatemala) (Miller, 1955).

En cuanto a su distribución, *P. labialis* está casi restringido a la vertiente atlántica del centro de Guatemala y al estado de Chiapas, México, y se distribuye, por tanto, por las cabeceras de la cuenca del Motagua, por el río Negro (en la cuenca del Grijalva-Usumacinta), por la cuenca del Polochic, por el río de Chiapa (cuenca del Grijalva-Usumacinta) y por el río Jataté. En afluentes del Pacífico, sólo es conocido en las tierras altas de Guatemala: río Samalá, río Panajachel y río Madre Vieja. Su rango altitudinal varía desde 400 m en la cuenca del Chiapa a 2400 m cerca de Totonicapán (Miller 1955).

Esta especie se caracteriza por tener la mandíbula inferior tan ancha y tan fuerte como la superior, e igual en proyección o incluida en la superior. No presenta puntos oscuros en la base de la aleta caudal. Tiene de 36 a 38 (34-39) escamas laterales y 36 o 37 (35-39) vértebras.

Profundulus labialis es tan variable, o más, que *P. punctatus*. No existe un claro patrón de variación que se correlacione con la posición geográfica y se da tanto entre poblaciones de cuencas bien aisladas como entre poblaciones de la misma cuenca.

Profundulus mexicanus Álvarez y Carranza 1951, descrito en la quebrada San Francisco, Ococingo (Chiapas, México) es considerado sinónimo de *P. labialis* por Miller (1955) y por Lázara (2001).

1.2.2.2. *Profundulus candalarius* Hubbs, 1924

El espécimen tipo de *P. candalarius* Hubbs 1924 viene de un manantial calizo en Candelaria, a 30 km de Nentón (Guatemala, cerca de la frontera mexicana).

Su distribución está restringida al río Grande de Comitán, en el centro y sur de Chiapas, México, y a un manantial en Candelaria, Guatemala, que presumiblemente está o estaba conectado de algún modo con la cuenca de Comitán (Miller, 1955)

En cuanto a su variación, comparaciones de cinco colecciones revelan que son más variables en morfología externa que en caracteres merísticos (Miller, 1955).

Se diferencia de *P. labialis* en el número de escamas laterales, normalmente 34 (33-36) y en las vértebras, normalmente 34 (33-35).

1.2.2.3. *Profundulus hildebrandi* Miller, 1950

Profundulus hildebrandi Miller, 1950 fue descrita en San Cristóbal de las Casas (Chiapas, México) en una laguna que en actualidad tiene tal grado de deterioro que impide la vida piscícola (Doadrio, observaciones personales).

En cuanto a su distribución, cabe señalar que aunque Miller (1955) afirma que sólo es conocida en la alta y aislada meseta caliza cerca de San Cristóbal de Las Casas en el centro de Chiapas, a 2200 m sobre el nivel del mar.

Se caracteriza por tener la mandíbula inferior ancha y fuerte y tan sobresaliente que incluye a la mandíbula superior; el cuerpo es uniformemente delgado, con un punto oscuro en la base de la aleta caudal. El número de escamas y de vértebras es intermedio entre *P. labialis* y *P. candalarius*.

1.3. Biogeografía de la familia Profundulidae

La familia Profundulidae es monogenérica y para algunos autores (Miller, 1955) la más plesiomórfica del suborden Cyprinodontoides, el cual incluye seis familias distribuidas por América, sur de Europa, Oriente Medio y Próximo, África Tropical y Madagascar (Banarescu, 1991). Ocupa dos de las provincias ictiológicas o áreas de endemismo de Centroamérica (Bussing, 1998): la provincia Usumacinta, que abarca las tierras bajas de Tabasco y la vertiente atlántica del este de México, y la provincia Chiapas/Nicaragüense en la vertiente pacífica. Seguramente este linaje endémico sea nativo de Centroamérica y probablemente evolucionó allí cuando esta porción de tierra se encontraba aislada de Norteamérica y de Suramérica (Banarescu, 1991) ya que, geológicamente hablando, América Central no forma parte ni de Norteamérica ni de Suramérica, sino que representa un tercer elemento entre las dos (Miller, 1955; Ross y Scotesse, 1988). El fósil más antiguo de los ciprinodóntidos del Nuevo Mundo es un espécimen del Mioceno perteneciente al género *Fundulus* (Lugaski, 1977). Por lo tanto, todas las diferenciaciones de este género habrían ocurrido, como mínimo, a partir del Mioceno (Uyeno y Miller, 1962; Hubbs *et al.*, 1974).

El género *Profundulus* parece estar estrictamente confinado al agua dulce y, por lo tanto, su dispersión sería totalmente independiente de la dispersión marina. Hay razones evidentes para creer que los dos subgéneros podrían haberse originado en áreas distintas de Centroamérica y que posteriormente se hubiesen encontrado en simpatria por diversos cambios naturales topográficos, como son la captura de ríos y arroyos (Miller, 1955).

Según Miller (1955), el subgénero *Tlaloc* se originaría posiblemente en las tierras altas de Chiapas, México, donde sus tres especies viven aisladas en la actualidad.

El mismo autor representa el escenario evolutivo de la siguiente forma: *P. hildebrandi* representaría un estadio temprano en la evolución del subgénero *Tlaloc*. La similitud con la mandíbula y la configuración de la boca con el subgénero *Profundulus* sería interpretada como el resultado de una convergencia secundaria. Su diferenciación dataría al menos del Plioceno; la meseta caliza (Meseta Central) en la cual vive es de edad Cretácica y forma la masa montañosa más elevada de Chiapas.

Para el mismo autor *P. candalarius* sería una ramificación relativamente reciente de *P. labialis* y se diferenciaría al separarse de la cuenca donde actualmente habita *P. labialis*. Las características de *P. candalarius* indicarían que esta especie sería un representante alopatrico de *P. labialis* y que habría divergido del tipo parental debido al aislamiento geográfico, el cual hubiera podido tener lugar en algún tiempo del Pleistoceno.

El patrón de distribución de *P. labialis* proporciona evidencias para indicar que esta especie se originó en lo que ahora es la cuenca del río Grande de Chiapas más que en la cuenca adyacente e independiente del Grijalva-Usumacinta.

Las especies del subgénero *Profundulus* probablemente se originarían en las tierras altas de Guatemala. Miller (1955) sugiere que *P. guatemalensis* (o sus formas ancestrales) sería la primera especie de *Profundulus* en dispersarse a la subcuenca del río Negro, y que *P. labialis* se dispersó posteriormente desde la cuenca del río Grande de Chiapas accediendo posteriormente a la cuenca del Motagua. Se podría considerar que el subgénero *Profundulus* es el más primitivo, siendo *P. guatemalensis* la especie más generalizada y que este grupo se originaría en las tierras altas al sur de Guatemala. Los dos subgéneros se habrían puesto en contacto posteriormente por cambios en el complejo hidrográfico, y por esa razón en la actualidad se encuentran en simpatría en la cuenca del Grijalva-Usumacinta, Polochic y Motagua.

Como se ha comentado con anterioridad, Centroamérica no forma parte ni de Norteamérica ni de Suramérica, geológicamente hablando, sino que representa un tercer elemento entre las dos. La mayor parte de las montañas de Guatemala son paleozoicas (y la mayor parte de las de Chiapas son del Mesozoico) y han existido sobre el nivel del mar desde entonces. En contraste, las tierras bajas pacíficas de Guatemala y sur de México, son del Pleistoceno y comprenden depósitos recientes. Por lo tanto, las tierras altas han provisto siempre de refugio a diversas especies las cuales se extinguieron de las tierras bajas por transgresiones marinas. El origen y diferenciación de *Profundulus* debió ocurrir en estas áreas aisladas que constituían las ahora denominadas tierras altas.



2. Justificación del estudio

2.1. Hipótesis

A partir de lo anteriormente expuesto, surgen y se plantean las siguientes hipótesis:

- 2.1.1. La información existente acerca de la familia Profundulidae no proporciona un conocimiento completo y satisfactorio acerca de su sistemática, evolución y biogeografía. Las modernas técnicas moleculares aportan datos relevantes en el estudio de la familia Profundulidae.
- 2.1.2. Es posible tener una nueva clasificación de este grupo, y encontrar nuevas especies porque la diversidad real es mayor que la considerada en la bibliografía.
- 2.1.3. El origen de la familia Profundulidae es supuestamente del Mioceno.
- 2.1.4. La variabilidad morfológica encontrada en las diferentes especies del género *Profundulus* se corresponde con la variabilidad genética.
- 2.1.5. La familia Profundulidae es un buen indicador de la paleohidrología de la zona y puede ayudar a conocer las relaciones históricas entre cuencas hidrológicas separadas.
- 2.1.6. Es posible conocer la causa de la distribución de las especies de la familia Profundulidae y los modelos biogeográficos de la zona de estudio.

2.2. Hipótesis sobre taxonomía: el concepto de especie

Para clarificar el estatus taxonómico de las especies de la familia Profundulidae se han seguido las recomendaciones de Sites y Crandall (1997) que plantean proponer *a priori* una hipótesis a contrastar e introducir un concepto de especie que formule unos criterios útiles y operativos para aceptar o rechazar esa hipótesis. Así se evita caer en el error de muchos de los trabajos realizados hasta el momento, que tratan los datos fuera de un marco conceptual y determinan *post hoc* y de una manera no rigurosa los límites entre especies. La ausencia de criterios específicos para la diagnosis de especies conduce a un diseño inadecuado del muestreo y, por lo tanto, a la obtención de unos resultados cuestionables y a un análisis erróneo de los mismos.

No es un objetivo de este estudio intentar resolver el problema filosófico del concepto de especie, ni aclarar su estatus ontológico, ni siquiera encontrar la mejor definición, pues muchos han sido los trabajos que han discutido esta cuestión a lo largo de la historia de las Ciencias Biológicas. Pero sí es necesario clarificar los límites entre especies mediante la formulación de hipótesis explícitas y operativas que se realicen *a priori* y diseñar el estudio para poder contrastar estas hipótesis de manera rigurosa.

Dos son los tipos de criterios que los científicos han propuesto para delimitar especies: (1) los relacionados con la reproducción (en ellos se basa el concepto biológico de especie, entre otros); y, (2) los relacionados con las líneas evolutivas (en ellas se basan los conceptos filogenético y evolutivo de especie) (Templeton, 1994; Sites y Crandall, 1997). Los criterios reproductivos para delimitar las fronteras entre especies tienen sus propias dificultades (Mallet, 1995) y no son operativos, entre otras: no se pueden aplicar a especies asexuales (Templeton, 1989), presentan una gran dificultad para ser aplicados a especies que hibridan (Whittemore, 1993) y no tienen una perspectiva histórica (Donoghue, 1985).

Nixon y Wheeler (1990) definen el concepto filogenético de especie como la menor agregación de poblaciones (sexuales) o líneas (asexuales) diagnosticables por una única combinación de estados de carácter en individuos comparables. Este criterio ha sido ampliamente adoptado y aplicado; Davis y Nixon (1992) han publicado algunas reglas explícitas para su uso. Recientemente, Baum y Donoghue (1995) han distinguido entre dos distintas aplicaciones de este concepto: las basadas en caracteres y las basadas en filogenias. Las primeras consideran que un organismo es miembro de una especie dada sí, y sólo sí, posee algún carácter o combinación de caracteres determinado(as). Las segundas consideran a un organismo como miembro de una especie dada sí, y solo sí, está históricamente relacionado a otros organismos de la misma especie. Las aplicaciones basadas en las historias evolutivas consideran a las basadas en caracteres como irrelevantes, aún así aceptan que los caracteres son, en la práctica, necesarios para reconocer especies y para asignar determinados organismos a determinadas especies. Bajo ambas consideraciones, los caracteres son la principal fuente de evidencia en la limitación de especies. Desde una perspectiva filogenética evolutiva, se contempla a las especies como grupos de organismos monofiléticos o exclusivos, y gracias a la descendencia, ascendencia y extinción de líneas, pueden darse independientemente de la existencia de sinapomorfías. Desde este punto de vista los caracteres sólo sirven para contrastar tales hipótesis.

Atendiendo a las anteriores consideraciones, y dentro del marco molecular en el que se desarrolla este trabajo, no se hará ninguna aplicación estricta del concepto filogenético de especie basado en caracteres, y se tendrá en cuenta el concepto filogenético de especie basado en la historia evolutiva, a pesar del problema de circularidad. Así, el criterio empírico que se ha definido mantiene que, al menos, un carácter molecular (aunque no esté necesariamente presente con una frecuencia del 100%) diagnostica al conjunto de poblaciones geográficas, el aislamiento reproductivo es el único proceso que garantiza la individualidad (es decir, la independencia evolutiva) de las líneas de organismos bisexuales, y este proceso se puede ver reflejado por la captura de estados de carácter aunque no hayan alcanzado la fijación. Además se tendrá en cuenta a cada momento la monofilia o exclusividad de los grupos obtenidos en las respectivas filogenias.

En definitiva, y tomando como referencia la información encontrada en la bibliografía, se propone una serie de criterios suficientes a tener en cuenta para definir especies sin tener que cumplirse necesariamente todos:

- a) Presencia de alelos marcadores o exclusivos.
- b) Valores de F_{st} mayores de 0,5 entre poblaciones de distintas especies.
- c) Distancias genéticas de Nei en estudios de alozimas mayores de 0,2.
- d) Un porcentaje de divergencia genética en las ATPasas 6 y 8 mayor o igual a 1,3%.
- e) Que sean grupos monofiléticos, es decir, que todas las poblaciones o especímenes analizados de esa especie sean monofiléticos.

2.3. Objetivos

Son varias las hipótesis que se recogen en las consideraciones anteriores. La falta de trabajos de sistemática molecular y variabilidad genética sobre esta familia, impide contrastarlas. La posibilidad que se presenta en la actualidad para desarrollar técnicas moleculares permite plantear y abordar los siguientes objetivos:

- 2.3.1 Clarificar el estatus taxonómico de las especies de la familia Profundulidae y la constatación de sus límites biogeográficos mediante el análisis de todos los *taxa* citados en el área de distribución, con el fin de establecer la diversidad real existente y la correlación con la plasticidad fenotípica descrita previamente.
- 2.3.2 Conocer la estructura de la variabilidad genética y de los patrones de variación de la familia Profundulidae, y ver así si existe alguna correlación con el tipo de medio o con fenómenos de aislamiento. El estudio de la variación y diferenciación genética de los *taxa* analizados sirve, además, para comprobar si el nivel taxonómico en el que se encuentran es el correcto.
- 2.3.3 Analizar las relaciones evolutivas entre las diferentes especies de la familia Profundulidae, así como su posible origen biogeográfico y evolutivo, con la finalidad de elaborar una filogenia para la familia y establecer una clasificación basada en el grado de parentesco.
- 2.3.4 Conocer la biogeografía histórica y la paleohidrología de la región basada en las relaciones de parentesco. Para ello se estudiará la corología, actualizando los mapas de distribución de las especies de la familia Profundulidae e incluyendo los patrones de distribución en un árbol filogenético, comparando las hipótesis biogeográficas resultantes con las propuestas por Miller (1955). Además se estudiarán los cambios de distribución de los organismos a través del tiempo geológico, con el fin de obtener posibles explicaciones históricas de las distribuciones de los organismos en relación a procesos geológicos y evolutivos (dispersión, centros de origen, refugios y fenómenos de vicarianza). A partir del análisis de distribución de los organismos se puede inferir la existencia y la localización de acontecimientos geográficos del pasado y de los fenómenos geológicos asociados.

2.3.5 Proponer nuevas líneas de investigación para la familia y directrices de gestión para su conservación.

Se ha pretendido analizar a la familia Profundulidae teniendo en cuenta la escala macroevolutiva (la filogenia) y la microevolutiva (la variabilidad genética). Los cambios producidos a pequeña escala pueden revelar patrones comunes acerca de la evolución sufrida por los organismos, pero no proporcionan una explicación completa si no se tienen en cuenta los cambios producidos a una gran escala, es decir, a nivel macroevolutivo.



3. Material y métodos

3.1. Área de estudio

En este estudio se ha intentado abarcar la mayor parte del área de distribución de la familia Profundulidae (Figura 1). Así, se han incluido poblaciones muestreadas desde la cuenca del río Balsas en Guerrero (México) hasta la del Guacalate en Sacatepéquez (Guatemala), en la vertiente pacífica, y desde la cuenca del Grijalva-Usumacinta, en Chiapas (México), hasta la del Polochic, en Alta Verapaz (Guatemala), en la atlántica.

El área de estudio se encuentra situada entre el Trópico de Cáncer y el Ecuador, lo que determina su condición tropical. Básicamente se pueden distinguir dos regiones naturales: (1) las tierras altas tropicales, que comprenden todo el altiplano, las montañas altas y medias y los valles intermontanos, territorios que conforman un enclave de vegetación y fauna neárticas, presentando temperaturas que no son inferiores a los 12 °C de promedio anual y no mayores de 25 °C; y (2) las tierras bajas tropicales, donde se encuentran las zonas costeras y las cuencas bajas de los ríos, con vegetación y fauna neotropical y temperaturas promedio anuales superiores a los 25 °C.

El área de estudio se encuentra situada en el sector oriental del llamado “Cinturón de Fuego” del Océano Pacífico, está sujeta a movimientos telúricos y es sumamente rica en manifestaciones volcánicas. Presenta un gran contraste geográfico, en ocasiones con un relieve muy accidentado que dificulta las comunicaciones y con diferencias muy sensibles de alturas sobre el nivel del mar, lo que determina la existencia en pocos kilómetros de variedad de microclimas, un gradiente desde tropicales húmedos hasta semisecos, con su vegetación y fauna respectivas. En las costas y en las cuencas bajas de los ríos hay climas cálidos subhúmedos, en la mayor parte de las montañas bajas y en los valles intermontanos los climas son cálidos y semicálidos, subhúmedos y semisecos. En las altas montañas de las vertientes del Golfo y del Pacífico se presentan climas templados húmedos y subhúmedos. Debido a la diversidad de los factores geográficos que afectan al territorio, la cantidad de lluvia que recibe es variable. Su volumen es mayor en las zonas de bosque tropical y va disminuyendo a un mínimo en las zonas semisecas de vegetación xerofítica o de monte bajo caducifolio (Rodrigo Álvarez, 1994).

3.2. Material

En primer lugar y para el estudio mediante la electroforesis de aloenzimas, se han analizado 502 ejemplares del género *Profundulus* que proceden de 34 localidades diferentes, repartidas a lo largo de toda su área de distribución. Estas muestras incluyen topotipos o localidades muy próximas a la *terra typica* de 9 de los 10 *taxa* que han sido descritos para este grupo, aunque únicamente se consideran como válidas las especies que Miller (1955) y autores posteriores (Espinosa *et al.*, 1993; Huber, 1996; Lazara, 2001) han aceptado: *P. punctatus* y *P. guatemalensis*, dentro del subgénero *Profundulus*; y *P. labialis*, *P. candaliarius* y *P. hildebrandi*, dentro del subgénero *Tlaloc*. Únicamente no se han colectado ejemplares del lago Atitlán donde

fue descrita la especie *P. pachycephalus*, sinónima de *P. punctatus* según Miller (1955). En la actualidad no existen individuos del género *Profundulus* en este lago, y según este autor fue introducida artificialmente junto con otros peces.

Así, del subgénero *Profundulus* se han estudiado topotipos de *P. guatemalensis* del río Guacalate, en la cuenca del mismo nombre (San Miguel Dueñas, Sacatepéquez, Guatemala) y de una localidad cercana a la *terra typica* de *P. punctatus*. De esta última especie la localidad tipo es la laguna costera de Champerico cerca de Chiapam, un hábitat donde nunca han sido encontradas especies del género *Profundulus* (Miller, 1955). En la actualidad estas lagunas se dedican al cultivo del camarón por lo que los peces han sido eliminados. En una expedición realizada por nosotros, se muestreó intensamente el río Bolas en una entrada de esta laguna con influencia mareal, donde no se colectaron individuos de este género. Además, el tramo bajo del río Bolas no parece ofrecer buenas condiciones para la existencia de esta especie, por ello Miller (1955) considera que la *terra typica* de *P. punctatus* debe ser un error de etiquetaje. Sin embargo en las cercanías del río Bolas y de la laguna Champerico, a no más de 5 km, parece existir un ojo de agua que, por encontrarse en una finca privada, no pudo ser muestreado. En estos ojos de agua que proporcionan agua fría y oxigenada es frecuente *P. punctatus*. Por ello no se descarta que la *terra typica* de *P. punctatus* sea correcta, ya que el ojo de agua se encuentra en Chiapam. En este tipo de surgimientos de agua dulce cercanos a la costa se ha encontrado, durante los trabajos de campo necesarios para llevar este estudio, ejemplares de *P. punctatus*, pese al comentario de Miller (1955). Por lo tanto, no se descarta que la localidad tipo fuera el surgimiento de agua cercano a la laguna de Chiapam. En este estudio se ha incluido ejemplares de *P. punctatus* muestreados en cuencas situadas a ambos lados del río Bolas. Además se han estudiado topotipos de *P. balsanus* del río Malinaltepec (Malinaltepec, Guerrero, México), de *P. scapularis* del río Bravo en la cuenca del mismo nombre (Finca Mocá, Suchitepéquez, Guatemala) y de *P. oaxacae* (el río Atoyac-Verde, en las proximidades de San Sebastián de las Grutas y El Guayabo, Oaxaca, México) considerando estas especies como sinónimas de *P. punctatus*.

Del subgénero *Tlaloc* se han colectado topotipos de *P. candalarius* de un ojo de agua a 3 km de Candelaria (Guatemala), precisamente en el nacimiento del río Lagartero (Finca Chacaj, Huehuetenango, Guatemala), de *P. hildebrandi* del río Peje de Oro (San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México), de *P. labialis* del río San Jerónimo (San Jerónimo, Baja Verapaz, Guatemala) y de su sinónimo *P. mexicanus* de la quebrada San Francisco del Río de la Virgen (Ococingo, Chiapas, México), estas cuatro últimas localidades dentro de la cuenca del Grijalva-Usumacinta.

Como grupo externo para los análisis filogenéticos realizados a partir de los resultados de electroforesis de aloenzimas se han utilizado muestras de *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766), procedentes de una población de Lebrija (Sevilla, Andalucía). Se trata de un grupo lo suficientemente cercano para que el agrupamiento no quede distorsionado. *Fundulus* es considerado como grupo externo adecuado porque Meyer y Lydeard (1993) lo consideran basal frente al clado Goodeidae y Profundulidae. Para los estudios filogenéticos de máxima verosimilitud y máxima parsimonia con aloenzimas, y debido a las limitaciones de los programas informáticos, se han elegido 20 poblaciones de entre las anteriores. Estas poblaciones representan a cada uno de los grupos resultado de aplicar el método de

agrupamiento UPGMA, comentado más adelante. Para el estudio de máxima parsimonia y debido también a problemas restrictivos con el paquete informático FREQPARS 1.0 (Swofford y Berlocher, 1987) han debido eliminarse algunos loci del estudio; así, tal como recomiendan los autores, se ha prescindido de algún locus monomórfico, ya que no son informativos; además, siempre se han reunido en un único alelo, dos alelos que son propios de un taxón.

Posteriormente, y para el estudio mediante la secuenciación del ADN mitocondrial (ADNmit), se ha intentado analizar un individuo de cada una de las poblaciones de las localidades que se han estudiado mediante aloenzimas, con la finalidad de que quedaran representadas en el nuevo análisis. Los individuos de las poblaciones con las abreviaturas Colo2, Ato1, Ato2, Ato4, Ato7, Pic, Que y Vir no se han podido secuenciar, probablemente por el estado de conservación del material congelado, así que en alguna ocasión se han añadido nuevas poblaciones próximas. En el caso de Teh2 y Cha se han secuenciado dos individuos. Como grupo externo se han utilizado una muestra de un individuo de la familia Fundulidae, *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766), procedente de una población de Lebrija (Sevilla, Andalucía) y otra muestra de la familia Goodeidae, *Skiffia bilineata* (Bean, 1887), procedente de una población de la presa de Cointzio en el río Lerma (Michoacán, México). Como se comentó anteriormente, se tratan de dos grupos lo suficientemente cercanos a *Profundulus* para que el agrupamiento no quede distorsionado. *Fundulus* es considerado como grupo externo adecuado porque Meyer y Lydeard (1993) lo consideran basal frente al clado Goodeidae y Profundulidae.

En la tabla 2 aparecen las poblaciones y ejemplares estudiados, el número de individuos de las poblaciones estudiadas mediante electroforesis de aloenzimas y las localidades exactas donde se muestrearon, así como el río, la cuenca a la que pertenece y las vertientes. Estas localidades aparecen cartografiadas en la Figura 1.

Material y métodos

Tabla 2: poblaciones y ejemplares estudiados, el número de individuos de las poblaciones estudiadas mediante electroforesis (Nº) de aloenzimas y las localidades exactas donde se muestrearon. El asterisco (*) indica la *terra typica*. Los espacios que aparecen sin número (en blanco) en Nº corresponde a poblaciones en las que exclusivamente se han estudiado las secuencias que codifican los genes de las ATPasas 6 y 8.

Población	Abreviatura	Especie	Río	Cuenca	Localidad	Vertiente	Nº
Guacalate(*)	Gua	<i>P. guatemalensis</i>	Guacalate	Guacalate	San Miguel Dueñas (Sacatepéquez, Guatemala)	Pacífico	19
Polochic	Pol	<i>P. guatemalensis</i>	Cahabón	Polochic	Pasmolón (Alta Verapaz, Guatemala)	Atlántica	13
Bravo(*)	Bra	<i>P. punctatus</i>	Bravo	Bravo	Finca Mocá (Suchitepéquez, Guatemala)	Pacífico	20
Tolimán	Tol	<i>P. punctatus</i>	Tolimán	Tolimán	Belisario Domínguez (Chiapas, México)	Pacífico	20
Novillero	Nov	<i>P. punctatus</i>	Novillero	Novillero	San Pedro Tepanatepec (Oaxaca, México)	Pacífico	14
Chacalapa	Cha	<i>P. punctatus</i>	Chacalapa	Chacalapa	San Isidro Chacalapa (Oaxaca, México)	Pacífico	15
Coyul	Coy	<i>P. punctatus</i>	Coyul	Coyul	Santa María Huatulco (Oaxaca, México)	Pacífico	10
Tehuantepec-1	Teh1	<i>P. punctatus</i>	Guayabo	Tehuantepec	San Miguel Ecatepec (Oaxaca, México)	Pacífico	4
Tehuantepec-2	Teh2	<i>P. punctatus</i>	arroyo Livenstone	Tehuantepec	San Juan del Río (Oaxaca, México)	Pacífico	20
Colotepec-1	Col1	<i>P. punctatus</i>	Colotepec	Colotepec	San Gabriel Mixtepec (Oaxaca, México)	Pacífico	26
Colotepec-2	Col2	<i>P. punctatus</i>	Aguaate	Colotepec	Santos Reyes Nopala (Oaxaca, México)	Pacífico	22
Manaltepec	Man	<i>P. punctatus</i>	Nopala	Manaltepec	La Reforma, San Juan Lachao (Oaxaca, México)	Pacífico	4
Atoyac-1	Ato1	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Atoyac-Verde	San Isidro Sola de Vega (Oaxaca, México)	Pacífico	38
Atoyac-2	Ato2	<i>P. punctatus</i>	Agua del sabinio	Atoyac-Verde	El Guayabo (Oaxaca, México)	Pacífico	5
Atoyac-3	Ato3	<i>P. punctatus</i>	Grutas	Atoyac-Verde	San Sebastián de las Grutas (Oaxaca, México)	Pacífico	10
Atoyac-4	Ato4	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Atoyac-Verde	Santiago Yosondúa (Oaxaca, México)	Pacífico	10
Atoyac-5	Ato5	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Atoyac-Verde	Aldama (Oaxaca, México)	Pacífico	10
Atoyac-6	Ato6	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Atoyac-Verde	Chalcatongo (Oaxaca, México)	Pacífico	11
Atoyac-7	Ato7	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Atoyac-Verde	San Pedro Molinos (Oaxaca, México)	Pacífico	13
Atoyac-8	Ato8	<i>P. punctatus</i>	Cucharas	Atoyac-Verde	Putla de Guerrero (Oaxaca, México)	Pacífico	
Atoyac-9	Ato9	<i>P. punctatus</i>	Ojo de Agua	Atoyac-Verde	Sola de Vega (Oaxaca, México)	Pacífico	
Pichuacan	Pic	<i>P. punctatus</i>	Zangala	Pichuacan	El Vado (Oaxaca, México)	Pacífico	13
Quetzala	Que	<i>P. punctatus</i>	Cumiapa	Quetzala	El Zapote, Santa María (Oaxaca, México)	Pacífico	15
Mixteco-1	Mix1	<i>P. punctatus</i>	arroyo	Mixteco-Balsas	Tlaxiaco (Oaxaca, México)	Pacífico	5
Mixteco-2	Mix2	<i>P. punctatus</i>	Laguna Encantada	Mixteco-Balsas	Juxtlahuaca (Oaxaca, México)	Pacífico	7
Papagayo-1(*)	Pap1	<i>P. punctatus</i>	Malinaltepec	Papagayo	Malinaltepec (Guerrero, México)	Pacífico	19
Papagayo-2	Pap2	<i>P. punctatus</i>	Huachimil	Papagayo	Tlahuizapa, Cintalapa (Guerrero, México)	Pacífico	9
Grijalva	Gri	<i>P. punctatus</i>	Chiquito	Grijalva-Usumacinta	Cintalapa (Chiapas, México)	Atlántico	10
Jerónimo(*)	Jer	<i>P. labialis</i>	Jerónimo	Grijalva-Usumacinta	San Jerónimo (Baja Verapaz, Guatemala)	Atlántica	20
Selegua	Sel	<i>P. labialis</i>	Selegua	Grijalva-Usumacinta	Colotenango (Huehuetenango, Guatemala)	Atlántico	18
Comalatenango	Com	<i>P. labialis</i>	Comalatenango	Grijalva-Usumacinta	Nueva Morelia, Comalapa de la Frontera (Chiapas, México)	Atlántico	16
Virgen	Vir	<i>P. labialis</i>	Río de la Virgen	Grijalva-Usumacinta	Ocosingo (Chiapas, México)	Atlántico	15
Vergel	Ver	<i>P. labialis</i>	Fuente	Grijalva-Usumacinta	El Vergel (Chiapas, México)	Atlántico	
Santa Inés	Ine	<i>P. labialis</i>	Río Chihuahua	Grijalva-Usumacinta	Santa Inés (Chiapas, México)	Atlántico	
Grande	Gra	<i>P. candiarnus</i>	Río Grande de Comitán	Grijalva-Usumacinta	Emiliano Zapata (Chiapas, México)	Atlántico	19
Nentón(*)	Nen	<i>P. candiarnus</i>	Ojo de Agua	Grijalva-Usumacinta	Finca Chacaj (Huehuetenango, Guatemala)	Atlántico	22
San Cristóbal de las Casas(*)	Chi	<i>P. hildebrandi</i>	Nacimiento del Río Lagartero	Grijalva-Usumacinta	San Cristóbal de las Casas (Chiapas, México)	Atlántico	20
Lebríja	Leb	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Río Poje de Oro	Grijalva-Usumacinta	Lebríja, Sevilla (España)	Atlántico	21
Lerma	Ler	<i>Skiffia bilineata</i>	canales de irrigación presa de Coim�io	Guadaluquivir Lerma	Santiago, Undameco (Michoacan, México)	Atlántico	

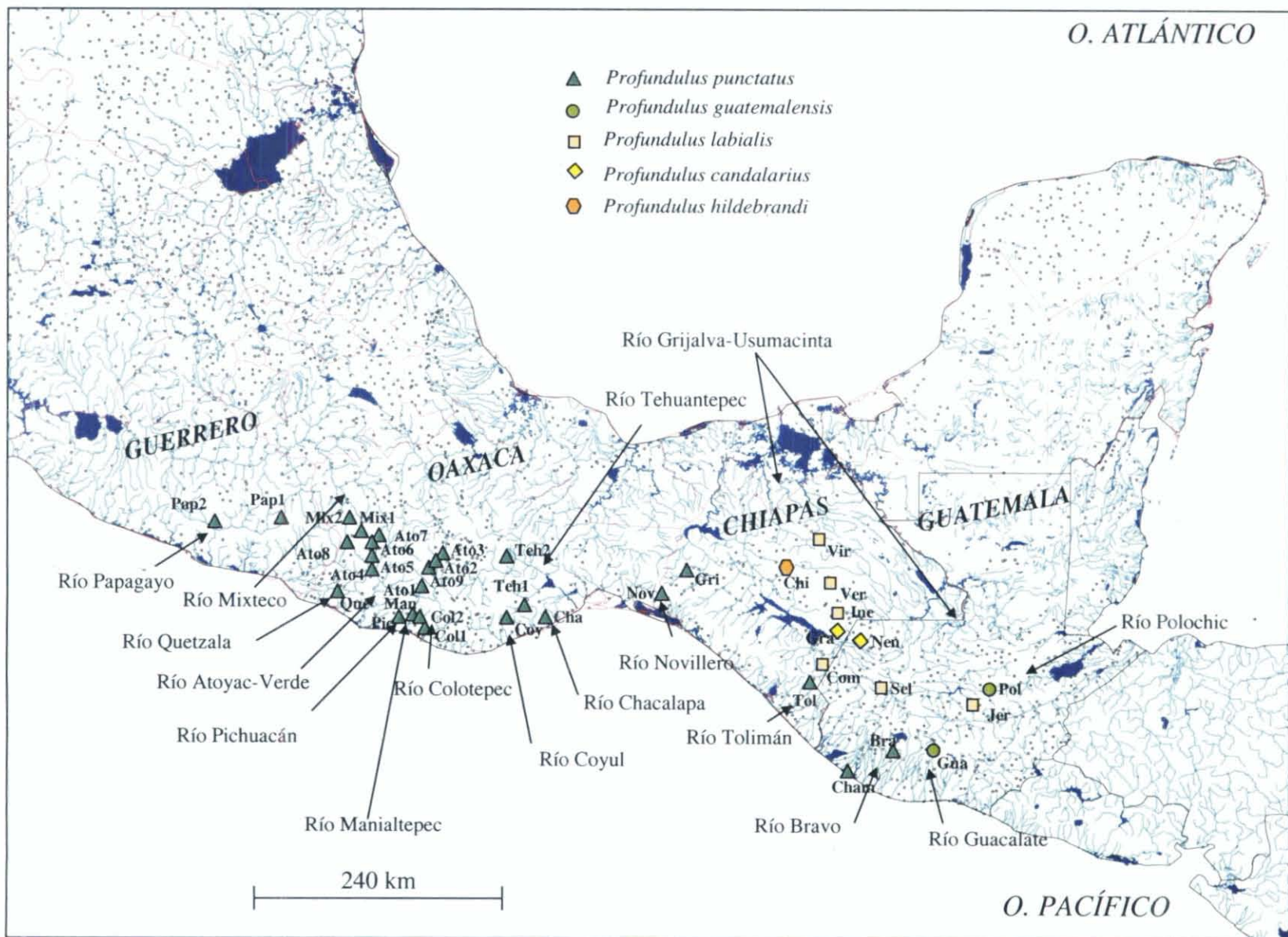


Figura 1: Distribución geográfica de las distintas especies de la familia Profundulidae y lugares donde se han muestreado las poblaciones y los ejemplares analizados. Aparecen señaladas las cuencas estudiadas.

3.3. Métodos

3.3.1. El método de captura de ejemplares

El método más utilizado para la captura de los ejemplares fue la pesca eléctrica realizada con un motor generador HONDA EX350, montado sobre una mochila. Este método es el más idóneo dada las características del hábitat y la baja conductividad de las aguas donde normalmente viven los individuos de esta familia. Los límites de utilización del aparato oscilan entre los 50 y 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$. La potencia del motor es de 300 w y la tensión de salida se puede regular: 150/200/300 V. Siempre se trabajó con intensidades de corriente lo suficientemente pequeñas como para evitar mortandades innecesarias en las poblaciones. Cuando fue necesario, bien por dificultades impuestas por el medio bien por otros motivos, también se pescó con salabre, atarraya y/o chinchorro de tamaños de malla variable. Los ejemplares se transportaron en hielo seco hasta el laboratorio donde se extrajo el músculo esquelético e hígado, aunque en ocasiones esta tarea se realizó *in situ* y las muestras se transportaron guardadas en tubos Eppendorf y mantenidas también en hielo seco, junto con los ejemplares disecados en formaldehído al 4%.

Los ejemplares utilizados en este estudio están depositados en las colecciones ictiológicas del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN) y en las del CIIDIR-Oaxaca (México).

3.3.2. Los métodos moleculares

En este estudio se han utilizado los datos y las técnicas moleculares porque son los más apropiadas para resolver los objetivos expuestos en el apartado anterior y poder contrastar las hipótesis planteadas. La idoneidad de las aproximaciones moleculares a este tipo de problemas se debe a que los datos con los que trabaja: (1) son genéticos (y por tanto informativos para las estimaciones filogenéticas); (2) permiten el acceso a una numerosísima información debido a la variabilidad genética; (3) pueden distinguir entre homología y analogía (uno de los problemas centrales de los filogenéticos); (4) son un buen instrumento para medir la divergencia y la diferenciación genética de cualquier grupo de organismos; y (5) permiten realizar aproximaciones mecanicistas a los cambios evolutivos.

Se ha de resaltar, dejando a un lado las controversias en sistemática molecular y el debate fenético-cladista, que este estudio no pretende preponderar los caracteres moleculares respecto de los morfológicos, sino más bien compararlos y complementarlos.

Existe una amplia variedad de técnicas de laboratorio que revelan marcadores genéticos moleculares. Las técnicas utilizadas en el presente trabajo han sido la electroforesis de proteínas y la secuenciación de ADN. Estas dos técnicas pueden proporcionar información acerca de la filogenia de las poblaciones en estudio; en la primera de ellas se han analizado varios individuos

por población y esto aporta información para estudiar la variabilidad genética de las poblaciones. Así se consigue realizar una aproximación a nivel micro y macroevolutivo.

3.3.2.1. La electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas en geles horizontales de almidón que se ha realizado se basa en la desarrollada por Pasteur *et al.* (1987), aunque con pequeñas modificaciones. Esta técnica se empezó a utilizar extensamente en los años 60, y durante esa década y la siguiente supuso un impulso para todos los estudios referentes a genética de poblaciones y taxonomía. Presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas moleculares (Ferguson *et al.*, 1995) que justifican su empleo: (1) es un análisis rápido y de un relativo bajo coste; (2) es una técnica sencilla en su aprendizaje y uso; (3) los loci analizados no presentan variación debida al sexo o estado de madurez (es la constancia de los caracteres genéticos); (4) son pocos los loci que están sujetos a selección natural; y (5) la analogía implica homología, los loci que presentan una migración análoga son considerados homólogos.

La técnica de la electroforesis se fundamenta en el hecho de que las proteínas en disolución, cuando se someten a un campo eléctrico, se desplazan a una velocidad que es determinada por sus cargas y por sus masas. Esta es la base de su diferenciación mediante el empleo de membranas porosas con carga sobre sus poros. La carga total de la molécula proteica viene determinada fundamentalmente por la secuencia de los aminoácidos que la componen y por la posición relativa de los mismos; ciertos grupos pueden quedar “enmascarados” debido a la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de la proteína. Las diferencias de carga, y por tanto de migración, dependerán además del pH del medio en el que se encuentran los aminoácidos, de la fuerza iónica, de la temperatura y/o de la presencia de otros ligandos. Además, es fundamental tener en cuenta el volumen de la molécula, porque la migración de la misma se verá afectada por el tamaño del poro del soporte físico sobre el que se hará migrar la proteína, en este caso un gel de almidón. Por tanto, en condiciones normales, la movilidad de una proteína va a aumentar con la carga neta que posea y con la diferencia de potencial del campo eléctrico al que se vea sometida, y por el contrario, disminuirá cuanto mayor sea su volumen y más concentrado esté el medio (Murphy *et al.*, 1990).

Los aminoácidos están codificados por tres nucleótidos -codón- y su variación supone en un gran porcentaje de casos la codificación para un aminoácido distinto. Hay una considerable redundancia de tripletes (casi todos los aminoácidos están especificados por más de un triplete del código); si es así, esta alteración puede provocar un cambio en la carga total de una determinada proteína y, por lo tanto, en su tasa de migración a lo largo de la membrana. Por esto, la electroforesis de proteínas es una técnica indirecta para obtener datos sobre el ADN de un determinado individuo, ya que se puede extrapolar que las diferencias de carga producidas por cambios en la secuencia de aminoácidos se traducen en cambios en el ADN (Machordom, 1992; Fernández Perdices, 1997; González, 1997).

Partiendo de la asunción de que cambios en la movilidad de las proteínas en un campo eléctrico reflejan cambios en el ADN que las codifica, se ha de asumir también que si hay

diferencias en los patrones de migración de las bandas de dos individuos, estas diferencias tienen una base genética y son heredables (Awise, 1974; Matson, 1984). Las bandas que se observan, consecuencia de la migración diferencial de las proteínas, son consideradas alelos diferentes de un mismo gen (aloenzimas) que segregan mendelianamente.

La electroforesis de proteínas es un método que permite comparar fácilmente la variabilidad de un alto número de genes ya sea entre individuos de una misma población, de diferentes poblaciones o de diferentes especies. En este caso se ha podido estudiar 28 individuos en un gel al mismo tiempo, y se han intentado estudiar el máximo número posible de enzimas.

Una vez señaladas las ventajas que puede proporcionar esta técnica corresponde citar una serie de inconvenientes, como son: (1) la necesidad de cantidades mas o menos grandes de un tejido vivo o congelado para el análisis, con lo que se tienen que sacrificar los individuos (es una técnica restringida, hoy por hoy, a muestras tomadas de animales vivos); (2) la necesidad de un sistema de refrigeración fiable para almacenar las muestras a bajas temperaturas (-70°C) y conseguir una óptima conservación; (3) la posibilidad de analizar exclusivamente proteínas hidrosolubles con tinciones histoquímicas (enzima-sustrato), lo que da lugar a una desviación en el muestreo de los genes (Awise, 1980) (se infiere, por tanto, la variabilidad de un individuo a partir de una muestra bastante reducida de su genoma, aunque este es un problema general de todas las técnicas moleculares); (4) el bajo polimorfismo que, en general, presentan los loci analizados si se compara con los obtenidos por otras técnicas moleculares; (5) la incapacidad de detectar el o los cambios mutacionales que dos alelos diferentes puedan haber sufrido (Harper, 1978; Bullini y Sbordoni 1980); (6) la baja detectabilidad de las mutaciones producidas en el ADN, ya que únicamente se detectan alrededor de un 30% (Ayala, 1983), las sustituciones aminoacídicas que no conlleven cambios en la carga neta de la proteína no van a ser reveladas con este método, con lo que estaría subestimando la variabilidad enzimática. Para evitar esto y cualquier relación con el fenómeno de la heterogeneidad escondida, por otra parte bien documentado (Coyne, 1982; Barbadilla *et al.*, 1996), los loci deberían ser escudriñados rutinaria y secuencialmente con múltiples tampones para maximizar el número de alternativas electroformas identificadas (Aquadro y Awise, 1982; Hedges y Burnell, 1990; Highton y Hedges, 1995) ya que un único paso en geles de electroforesis infravalorará la variabilidad electromórfica, tanto dentro de poblaciones como entre poblaciones; y, (7) la infravaloración de las estimas de variabilidad genética y de los tiempos de divergencia si el número de cambios entre dos individuos o especies fuese muy elevado, ya que se habrían producido con seguridad sustituciones nucleotídicas o aminoacídicas en una misma posición, que tampoco podrían ser valoradas.

El protocolo básico usado en el presente estudio sigue los pasos comentados por Pasteur *et al.* (1987) y que pueden resumirse en: obtención de los tejidos necesarios y su homogeneización en tampón adecuado; purificación del extracto de proteínas mediante centrifugación; migración de las proteínas en gel de almidón sometiénolas a un campo eléctrico; tinción histoquímica para el revelado de sistemas enzimáticos específicos; y, fijación y lectura de los zimogramas.

En un primer paso se homogeneizan los tejidos (músculo e hígado) por separado en un volumen similar de tampón de homogeneizado (Tris 0,01 M y EDTA 0,0025 M, a pH 7,0) al del tejido con que se cuenta, con un homogeneizador mecánico. Los tejidos homogeneizados son centrifugados durante 20 min a 17000 g, y a una temperatura media de 4°C, guardándose el sobrenadante con el total de proteínas hidrosolubles de ese tejido en otro tubo Eppendorf.

En el extracto de proteínas de cada individuo se sumergen papelillos de 1 cm x 0,5 cm de papel Watman n°3 y se insertan verticalmente en geles de almidón hidrolizado al 12% previamente preparados. Los geles se preparan sobre moldes de metacrilato de 480 cc siguiendo el protocolo y usando los tampones obtenidos de Pasteur *et al.* (1987). Para la elaboración de los geles los tampones usados fueron: Tris-citrato (pH 6,7), Tris-maleato-EDTA (pH 6,9) y Poulik (pH 8,7). Los tampones específicos para los electrodos son Tris-citrato (pH 6,3), Tris-maleato-EDTA (pH 6,9) y Borato (pH 8,2), respectivamente.

Se añade azul de bromotimol como marcador de la migración y se cargan las muestras en el gel (28 individuos por gel). Se conectan dichos geles al campo eléctrico usando esponjillas absorbentes para ponerlos en contacto físico con el tampón de electrodos (a un pH y una concentración determinada). Dependiendo del tipo de gel, la migración dura entre 6 y 10 horas, aplicando una intensidad entre 40 y 70 mA y una diferencia de potencial entre 100 y 240 V.

Durante la migración se preparan las tinciones específicas que se proyectan realizar. Esta preparación se completa en el momento de su utilización, ya que ciertos productos no pueden ser mezclados más que en ese instante, perdiendo de no ser así su actividad.

Tras la migración se retiran de los geles los papelillos con los que se cargaron las muestras y se procede a cortarlos obteniéndose 4 ó 5 láminas delgadas de aproximadamente 2 mm de grosor. Se colocan independientemente en cubetas de plástico para su posterior tinción. Cada lámina es teñida de forma específica, llegando así a revelar, para un gel, cuatro o cinco sistemas enzimáticos distintos para la casi treintena de individuos incluidos.

Previamente, se realizaron estudios que permitieron concretar cual era la coloración más apropiada para cada gel de acuerdo con el tipo de tampón usado, el pH del mismo y tejido empleado. Una vez delimitados los sistemas enzimáticos que ofrecen mejores resultados, se procede a su análisis en rutina para todos los individuos considerados en este estudio. Así, cada lámina obtenida de un gel es coloreada específicamente para revelar una determinada enzima de entre el total existente en el tejido, mediante una tinción histoquímica concreta que indicará la posición exacta a la que ha migrado en el gel apareciendo una banda visible. A la representación de varias bandas se conoce con el nombre de zimograma. Existen varios tipos de tinciones. La tinción histoquímica más frecuente consiste en aprovechar la función enzimática de la proteína para obtener un producto final coloreado aunque, a veces, la sustancia coloreada es un producto intermedio de la reacción. Otras tinciones colorean específicamente cuerpos químicos asociados (glúcidos, lípidos, grupos aminados...) presentes en las proteínas y que son susceptibles de tinción (Machordom, 1992).

Los protocolos de las tinciones histoquímicas se obtuvieron de Pasteur *et al.* (1987) y sólo algunos sufrieron pequeños ajustes para incrementar la resolución de los zimogramas. Cuando las bandas de los zimogramas se aprecian claramente se detiene el revelado histoquímico mediante un fijador consistente en etanol, ácido acético y agua (en proporción 4:5:1) cuando la tinción lleva agar o ácido acético al 5% si no lo lleva.

Una vez fijados los geles se procede a la lectura de los zimogramas, se ha intentado seguir las recomendaciones de Shaklee *et al.* (1990) y tomar el alelo más frecuente como referencia asignándole el valor "100", aunque como se puede observar en el anexo 1 no siempre ha podido ser así como resultado de diferentes correcciones. Los demás alelos se codifican con un valor relativo dependiendo de su migración respecto al alelo "100" de referencia. Para los loci se empieza a numerar a partir del primer locus de migración anódica más cercano al origen y se continúa con los loci de migración catódica también más cercanos al origen. Se coloca delante del nombre del locus una *m* (Shaklee *et al.*, 1990) si se sabe, por la literatura consultada, que este locus es el correspondiente al ADNmit. Una vez interpretados los geles se conservan en seco para posibles comprobaciones ulteriores. En coloraciones al agar las bandas quedan marcadas en éste. La fijación permite también que el agar pueda desprenderse fácilmente del almidón. Se coloca entonces el agar sobre un papel absorbente y se deja secar. Este papel puede conservarse posteriormente sin ningún tipo de problemas. Para las coloraciones llamadas líquidas, aquellas que no llevan agar, después de una hora al menos de fijación, el gel se sumerge en glicerol al 10% durante 24 horas. Tras este tiempo, se sitúa sobre una placa de vidrio entre dos papeles de celofán embebidos a su vez en glicerol al 10%. El gel se deja secar hasta que se vuelve translúcido y sólo son aparentes las isozimas (bandas coloreadas). En este momento el gel se coloca entre dos hojas de papel para su almacenamiento, ya que la eliminación total de la humedad es muy lenta.

En la tabla 3 aparecen los 14 sistemas enzimáticos analizados en este estudio, con sus 21 loci y el tejido en el cual se expresan. Además se indica el tampón utilizado para la elaboración de cada gel.

Así, tras realizar las electroforesis de proteínas oportunas, se procede a la descripción de los zimogramas correspondientes. A un alelo se le puede denominar de diferentes maneras dependiendo de la frecuencia y extensión con la que se encuentra, así se tiene: (1) "alelo raro", si sólo aparece en una o en un grupo de poblaciones con una frecuencia inferior a 0,05; (2) "alelo marcador", si aparece únicamente en una o en un grupo de poblaciones con una frecuencia igual a 1; y, (3) "alelo exclusivo" si solamente aparece en una o en un grupo de poblaciones con una frecuencia inferior a 1 y superior a 0,05. A la hora de denominar los alelos se ha tomado como límite el subgénero, así por ejemplo, si algún alelo aparece en un grupo de poblaciones de un subgénero con frecuencia 1 se le considera fijado en esas poblaciones independientemente de que aparezca en el otro subgénero.

Enzima	Nº C. E.	Locus	Tejido	Tampón
Aspartato aminotransferasa	2.6.1.1	AAT-1*	H	TC 6,7
		AAT-2*	M	TC 6,7
		AAT-3*	H	TC 6,7
Adenilato-quinasa	2.7.4.3	AK*	M	TC 6,7
Creatina-quinasa	2.7.3.2	CK*	M	TC 6,7
Esterasa	3.1.1.1	¹ EST-1*	M	TME
		EST-2*	M	TME
Fumarato hidratasa	4.2.1.2	FUM*	M	TME
Glucosa-6-fosfato isomerasa	5.3.1.9	PGI-1*	M	POULIK
		PGI-2*	M	POULIK
Isocitrato deshidrogenasa (NADP+)	1.1.1.42	IDH-1*	M	TC 6,7
		IDH-2*	H	TC 6,7
L-Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	LDH-1*	M	POULIK
		LDH-2*	M	POULIK
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH-1*	M	TC 6,7
		MDH-2*	H	TC 6,7
Enzima málico (NADP+)	1.1.1.40	ME*	M	POULIK
Manosa-6-fosfato isomerasa	5.3.1.8	MPI*	M	TC 6,7
Fosfogluco-mutasa	5.4.2.2	PGM*	M	POULIK
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	1.1.1.44	6PGD*	H	TC 6,7
Superóxido dismutasa	1.15.1.1	SOD*	H	TC 6,7

Tabla 3: Sistemas enzimáticos y loci analizados, tejidos (H=hígado, M=músculo) y tampones utilizados, TC 6,7=Tris-citrato (pH=6.7), POULIK=Poulik (pH=8.7), TME=Tris-maleato-EDTA (pH=6.9). ¹EST-1*, EST-2* sustrato empleado alfa y beta-Naftil-propionato 1% en acetona. Nº C.E. Número de la comisión enzimática.

Aunque los métodos de conservación de los geles proporcionan una muy buena imagen de los resultados y sobre todo la posibilidad de corroborar posteriormente los datos, el mejor momento para la lectura o interpretación de los electroforegramas (patrones obtenidos para cada enzima) es aquel en el que se decide fijar el gel, es decir, cuando la tinción ha llegado a su punto de máxima resolución.

Los patrones obtenidos pueden ser considerados datos fenotípicos de los individuos estudiados. Gracias al conocimiento del determinismo genético simple de las enzimas analizadas, se puede extrapolar su variabilidad a una variabilidad genética, que permite estimar el polimorfismo genético en el seno de una población, de una especie, entre poblaciones, especies, etc. (Lewontin, 1974). Así, se hablará de aquí en adelante de genotipos observados para la explicación de los electroforegramas obtenidos.

Esta técnica proporciona un tipo de datos adecuados para poder abordar la problemática que se plantea en este estudio y poder resolver los objetivos. El estudio de la variación de las frecuencias alélicas posibilita analizar la estructura genética de las poblaciones, nivel de flujo genético y migración, o su estructura reproductora. Para esto, una de las premisas claves al

utilizar los datos es considerar todos los alelos de una misma enzima selectivamente iguales o neutros. Asimismo, la electroforesis es un método excelente para estudiar la cohesión reproductora entre poblaciones a través de marcadores alélicos. La fijación de diferentes variantes alélicas en distintas poblaciones indica la ausencia de reproducción entre ambas. Esta cohesión es la que define a una especie (según el Concepto Biológico de Especie, Mayr, 1942). Es por tanto una herramienta taxonómica bastante útil para diferenciar especies crípticas o morfológicamente muy conservadoras.

La electroforesis de aloenzimas ha sido muy utilizada también para la determinación de relaciones filogenéticas entre especies, ya sea por métodos cuantitativos (de distancias, fenéticos) o cualitativos (utilizando estados de caracteres). En el primer caso, se calculan distancias genéticas entre los grupos estudiados a partir de sus diferencias en frecuencias alélicas. Asumiendo una relativa constancia en los ritmos de evolución de las proteínas entre los grupos se pueden determinar los tiempos relativos de divergencia entre ellos y por tanto cuáles están filogenéticamente más emparentados. En el segundo caso, se emplean estados de caracteres para determinar las relaciones de parentesco, ya sean los estados de carácter presencia/ausencia de alelos, alelos de diferentes loci o genotipos presentes. Esto implica asumir la homología de los alelos que codifican para un mismo enzima, hecho éste bastante controvertido. Además, la propiedad observable que distingue a los alelos, esto es, su movilidad, no es suficientemente válida para determinar la dirección o polaridad de los cambios entre alelos (Buckley, 1996).

3.3.2.2. La secuenciación del ADN mitocondrial

La secuenciación de ADN es una de las aproximaciones moleculares más idóneas para inferir la historia filogenética de poblaciones o especies y para evaluar patrones y procesos macroevolutivos, con aplicaciones taxonómicas y sistemáticas. Las filogenias específicas también son utilizadas para estimar directamente la especiación, la biogeografía y la coespeciación.

La ventaja de este método es que trabaja directamente con los nucleótidos, las unidades básicas de información codificadas en organismos. Además, es relativamente fácil modelar la evolución de las secuencias, y el tamaño potencial de la información que puede proporcionar el conjunto de datos es inmenso.⁴

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) y la posibilidad de secuenciar el ADN de forma sencilla y rápida han facilitado el acceso directo a la información filogenética contenida en las secuencias de ADN. Como resultado, la secuenciación de ADN ha tenido un gran crecimiento en la última década y ha resultado uno de los métodos más populares para la reconstrucción filogenética.

Son muchas las estrategias que permiten obtener la secuencia del ADN que se va a utilizar en sistemática, y todas tienen en común estos cuatro pasos básicos: primero, identificar la

secuencia diana particular que contenga una cantidad de variación apropiada entre las especies o individuos a estudio; segundo, amplificar esta secuencia diana de cada individuo, aislarla y purificarla; tercero, secuenciar el ADN purificado y finalmente alinear las secuencias homólogas.

A continuación se explicará en detalle la metodología seguida, basada en la utilizada por Zardoya (1994) pero con modificaciones:

Para el aislamiento del ADN total del género *Profundulus* se realizó una extracción con fenol/cloroformo a partir del músculo. Se toma parte de este tejido y se rompe por congelación con nitrógeno líquido. Se añaden 600 µl de tampón de homogeneizado (CINa 0,14 M, acetato magnésico 1,5 mM, KCl 5 mM) SDS 1%. Para eliminar las proteínas se realizan distintos lavados con 600 µl de fenol/diclorometano isoamílico (24:1) (v:v) hasta obtener una interfase limpia incubándose durante 10 min. Tras cada incubación se centrifuga a 15000 g durante 10 min y a 4 °C. Se recoge la fase acuosa y para eliminar los restos de fenol se añade 600 µl de diclorometano isoamílico. Se realiza una nueva centrifugación y se recupera la fase acuosa. Se precipita el ADN con acetato sódico 0,3 M, pH 6,8 y 100% etanol frío (2,5 vol.) Se agita suavemente y se deja reposar 1 h a -20°C. Seguidamente se centrifuga a 15.000 g durante 10 min a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y se añade alcohol al 70% (-20°C), para eliminar los restos de sales. Se seca completamente la muestra y se añade el doble de peso de agua estéril del que se tenía al principio de tejido y se deja toda la noche a 4 °C para que se hidrate y se vaya resuspendiendo. Se prepara un gel de agarosa al 0,8% en tampón Tris-Acetato. Se añade bromuro de etidio 0,5 µg/ml. En cada pocillo se añaden 3 µl de muestra y 1 µl de azul de bromofenol 0,25% (contiene sacarosa al 40% que aumenta la densidad de la preparación). El gel migra entre 80-100V durante aproximadamente 40-60 min y se observa con luz ultravioleta.

La PCR es una técnica por la cual se amplifica una región aislada y elegida de un ácido nucleico diana de un modo rápido y fiable. Es una técnica muy versátil, ya que la muestra de ADN que se quiere amplificar puede ser una mínima parte de una mezcla compleja de materiales biológicos. Esta técnica consta de 3 fases: (1) desnaturalización de la doble cadena de ADN mediante calor; (2) hibridación de los cebadores de extensión con las regiones de la secuencias que delimitan la región que va a ser amplificada; se basa en la especificidad de reconocimiento que proporciona la complementariedad de bases; y (3) la extensión de las cadenas complementarias de las regiones comprendidas entre los cebadores con una ADN polimerasa termoestable, que puede añadir nucleótidos incorrectos a las cadenas de ADN que están creciendo, lo que significa que el ADN sintetizado no es siempre una copia veraz de la secuencia diana, aunque la mayor parte de las polimerasas sean capaces de reconocer los errores y repararlos gracias a la actividad 3' a 5' exonucleasa.

Las regiones de ADNmit del género *Profundulus* que interesan en este estudio, los genes que codifican para las ATPasas 6 y 8, fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Para un volumen de 25 µl de muestra de ADNmit se añadió 2,5 µl de tampón 10x de PCR (75 mM Tris-HCl pH 9,0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 2,5 U de la ADN polimerasa termoestable procedente de la bacteria termofílica *Thermus thermophilus*

(Biotools), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M del cebador COIII.2 cuya secuencia 5'→3' es GTTAGTGGTCAK(G/T)GGGCTTGGR(A/G)TC y 0,5 μ M del cebador ATP 8,2 con secuencia 5'→3' AAAGCR(A/G)TY(C/T)R(A/G)GCCTTTTAAGC y agua para completar. Tras una primera etapa de 2 min a 94 °C, se realizaron entonces 30 ciclos, cada uno con las siguientes etapas: 45 s a 94 °C, 45 sg a 58 °C y 1 min 30 s a 72 °C, realizados estos ciclos hay una última etapa de 5 min a 72 °C. El termociclador utilizado es Mastercycler personal de Eppendorf. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1,5% y los que presentaban el tamaño esperado fueron ligados al vector pGEM-T.

Para clonar las regiones que interesan del ADNmit de *Profundulus* se eligió como vector el pGEM-T. A 5 μ l del producto de PCR se le añade 0,6 μ l del vector pGEM-T, 1 μ l de tampón de ligación 2X Rapid, 1 μ l de T4 ADN ligasa y 2,4 μ l de agua hasta completar un volumen de 10 μ l. Se incubó toda la noche a 4 °C.

El próximo paso consiste en la obtención de células competentes y la transformación. Para ello se sigue el método de Hanahan (1983). Así, se introduce los plásmidos recombinantes obtenidos previamente en bacterias *E. coli* (JM 109). Para ello, fue necesario previamente someter a esta bacteria a un tratamiento que la hiciese ser más receptiva a la entrada del vector. Una colonia de *E. coli* fue inoculada en 5 ml del medio de cultivo LB, y cultivada durante la noche en agitador a 37 °C. Los 5 ml de este cultivo fueron sembrados en 100 ml de medio LB fresco, incubado a 37 °C hasta que la densidad óptica alcanzada a 550 nm fue de 0,5-0,6 (equivalente a $4-7 \times 10^7$ células/ml). Posteriormente las células fueron recogidas mediante una centrifugación de 10 min a 6000 r.p.m. El sedimento fue resuspendido en 30 ml de tampón TFB1 (RbCl₂ 100 mM, MnCl₂ 4H₂O 50 mM, CaCl₂ 2H₂O 10 mM, AcK 30 mM y glicerol 15%). Tras una centrifugación de 10 min a 6.000 r.p.m., las células fueron resuspendidas en 2 ml de TFB2 (MOPS 0,1 M pH=7, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15%) y congeladas a -70 °C.

A cada una de las reacciones de ligación se añadieron 50 μ l de bacterias competentes y se incubó la mezcla durante 30 min en hielo. Se sometió a un choque térmico de 90 s a 42 °C y 2 min en hielo. Con el fin de posibilitar la reparación de las paredes celulares, éstas fueron incubadas en 200 μ l de medio LB (con 5 μ l/ml de Mg SO₄ (1M), 5 μ l/ml de MgCl₂ (1M) y 5 μ l/ml glucosa (2M)) a 37 °C durante 45 min. A continuación fueron sembradas en placas Petri con LB que contenían ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml, 20 μ l de X-gal al 2% y 25 μ l de IPTG. Las placas fueron cultivadas toda la noche a 37 °C.

Las colonias recombinantes se reconocen porque son blancas, ya que la presencia del inserto rompe el marco de lectura abierta (ORF) del gen LacZ del vector pGEM-T impidiéndose la síntesis de la β -galactosidasa y la consecuente metabolización del X-gal.

La extracción de ADN plasmídico de los clones seleccionados se realizó con modificaciones del método clásico de Birnboim y Doly (1979). Se seleccionan las colonias

blancas que hay en las placas y se crecen durante toda la noche a 37 °C en agitación y con 5 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml). El cultivo se centrifuga a 5000 r.p.m. durante 5 min, las células precipitadas se resuspenden en 250 µl de una solución que contiene 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA y 100 µg/ml ARNasa. A continuación se procede a la lisis de las bacterias mediante la adición primero de 250 µl de una solución con 0,2 M NaOH y SDS 1%, y segundo de 10 µl de solución proteasa alcalina. Tras una incubación de 5 min en hielo, se detiene la lisis alcalina mediante la adición de 250 µl de una solución con acetato potásico a 0,759 M y ácido acético glacial a 2,12 M pH 4,2. Se centrifuga a 14000 g durante 10 min. El sobrenadante se pasa a una columna Wizard® Plus SV Minipreps Spin Column (de Promega) donde se filtra al vacío. Seguidamente se limpia el ADN que está en la membrana con acetato potásico 162,8 mM y Tris-HCl, pH 7,5 en etanol. A continuación se seca el ADN mediante una centrifugación 14000 g durante 2 min y se añaden 100 µl de agua.

Para poder asegurar la presencia de inserto en los plásmidos, se realizó una digestión de 2 h a 37 °C con *Apa-I* y *Pst-I*. Una electroforesis en geles de agarosa al 1,5% permitió identificar aquellos clones que contenían los insertos buscados según su tamaño.

El ADNmit ha sido particularmente útil a la hora de estudiar en detalle las relaciones filogenéticas debido a su reducido tamaño, a su alto número de copias por célula, a que se transmite a través de las líneas maternas (los genotipos del ADNmit representan caracteres no recombinantes) y a su comportamiento evolutivo (en vertebrados, la tasa de sustitución génica es 5-10 veces mayor en los genes mitocondriales que en los genes nucleares) (Brown *et al.*, 1979; Vawter y Brown, 1986). El ADNmit de vertebrados es una molécula circular cerrada, normalmente con una longitud de 15-20 kb y compuesta por 37 genes que codifican para 22 tARNs, 2 rARNs y 13 mARNs, de proteínas involucradas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Wallace, 1986). Una región control de cerca de 1 kb inicia la replicación y la transcripción. El orden de los genes en ADNmit es generalmente estable en vertebrados, aunque existen diferencias que distinguen algunos *taxa* animales. Además, se conoce bastante bien el comportamiento evolutivo del ADNmit. Los individuos son comúnmente homoplásmicos, con una única secuencia de ADNmit que predomina en todos los tejidos, salvo excepciones. El motivo para esta relativa homogeneidad en la secuencia de un mismo individuo, es probablemente un cuello de botella que disminuye el número de ADNmit en las células germinativas intermedias. Por lo general, el ADN evoluciona rápidamente a nivel de las secuencias, en parte debido a que faltan mecanismos de reparación de las mutaciones producidas durante la replicación. Algunas secuencias dentro de la región de control evolucionan con excepcional rapidez y son útiles en el análisis de la estructura de poblaciones.

El ADNmit presenta una serie de ventajas en el estudio de procesos evolutivos: su rápida tasa de evolución que implica sobre todo sustituciones de bases y no muchas adiciones/delecciones; su notable estabilidad del contenido genético; su homoplasticidad, es decir, la aparente homogeneidad de la secuencia en células somáticas; el gran polimorfismo de secuencias entre individuos coespecíficos y su transmisión materna a la progenie. Pero todo esto son generalidades y existen excepciones que se han comprobado empíricamente, como la transmisión con éxito desde el padre, la falta de detectabilidad de las variantes de ADNmit que

dentro de un mismo individuo tienen baja frecuencia y casos de heteroplasma (Avice *et al.*, 1984). Las secuencias de ADNmit que han recibido mayor atención en la literatura científica han sido los genes que codifican para: el ARN ribosomal (12S y 16S), los citocromo-oxidasa I y II, el citocromo b y la región de control. Estos genes permiten abordar estudios de tipo comparativo tanto en grupos distantes como dentro de *taxa* concretos (Martin y Bermingham, 1999). Otros genes que están bien caracterizados, y que han servido para llevar a cabo estudios sistemáticos y de poblaciones, son los que codifican para las ATPasas 6 y 8 (Bermingham y Orti, 2001). Para conocer como se debía tratar las secuencias de estos dos genes en el estudio que se ha llevado a cabo, si juntas o por separado, se ha aplicado el test de la homogeneidad del paquete estadístico PAUP* v4.0 (Swofford, 1988).

Según Stepien y Kocher (1997), a pesar de que este tipo de estudios moleculares tienen un éxito espectacular resolviendo filogenias en los niveles taxonómicos más bajos, tienen un importante problema que resolver, el de la saturación. La saturación se produce cuando múltiples sustituciones enmascaran sustituciones previas en los mismos sitios, alcanzando un valor de equilibrio de la secuencia. Como consecuencia, no se recoge la variabilidad de todos los cambios y se pierde información, como puede ser por ejemplo el tiempo en el que se produjo una determinada ramificación. Este problema puede detectarse examinando de una manera detenida la evolución de cada posición. Para ello, se han representado las distancias no corregidas frente al número de cambios, transiciones y transversiones por separado.

Además se sabe que las sustituciones no se dan con la misma probabilidad en cada sitio del codón. Las distintas posiciones del codón evolucionan a tasas diferentes como consecuencia de la estructura redundante del código genético y del agrupamiento de aminoácidos, que son funcionalmente similares, de acuerdo a la segunda base del codón. Los modelos de evolución para los genes se suelen basar en una representación puramente estadística de las sustituciones en estos sitios (Kocher *et al.*, 1997). Así, para intentar recuperar la información filogenética de un análisis de secuencias moleculares hay que tomar dos decisiones importantes: primero, se debe elegir el modelo de sustitución que modele de una manera precisa la evolución de la(s) molécula(s) bajo estudio, incluso si las tasas de sustitución varían entre sitios; y posteriormente, como se verá adelante, se debe elegir un algoritmo para construir los árboles.

Para conocer el modelo de sustitución al que se ajustan las secuencias de este estudio se ha utilizado el programa MODELTEST v. 3.0 (Posada y Crandall, 1998). Este programa está diseñado para comparar los diferentes modelos de sustitución de ADN en un marco jerárquico para testar hipótesis. Este programa calcula el estadístico del test de probabilidad (*likelihood ratio test statistic*) $\delta = -2\log\Lambda$, donde $\Lambda = \max[L_0(\text{Modelo Nulo})] / \max[L_1(\text{Modelo Alternativo})]$. L_0 es la probabilidad bajo la hipótesis nula, modelo sencillo y L_1 es la probabilidad bajo la hipótesis alternativa, modelo complejo. También calcula su valor asociado *P*-value utilizando una distribución χ^2 con *q* grados de libertad (la diferencia en el número de parámetros libres entre los dos modelos) para rechazar o no rechazar distintas hipótesis nulas sobre los procesos de sustitución de ADN.

El modelo de evolución, seleccionado en MODELTEST 3.0 (Posada y Crandall, 1998) al que mejor se ajustan las secuencias del género *Profundulus* estudiadas, es el de Hasegawa-Kishino-Yano (1985), de aquí en adelante HKY+G. El modelo HKY+G no asume la misma frecuencia de bases y tiene en cuenta las diferencias entre transiciones y transversiones. El valor de *gamma* (G) da idea de la tasa de homogeneidad específica de cada sitio. Así, de acuerdo a una distribución *gamma*, se asigna a cada sitio una tasa diferente de heterogeneidad. La distribución es escalada de tal modo que la tasa media para todos los sitios es 1, el valor de *gamma* es el parámetro que describe la forma de la distribución. Cuando este parámetro tiene un valor bajo se está simulando un alto grado de tasa de heterogeneidad específica de cada sitio, y a medida que este valor aumenta los datos simulados resultan tener una tasa más homogénea (Yang, 1996). El modelo HKY+G es el que se ha utilizado para elaborar los dendrogramas y filogramas que se comentarán más adelante en el apartado acerca de la aproximación macroevolutiva.

Junto con la saturación antes comentada, Naylor *et al.* (1997) citan tres problemas que pueden desvirtuar la filogenia real y que deben ser considerados al evaluar toda inferencia filogenética a partir de datos de secuencias de ADNmit. Estos son: (1) la probable dependencia de los caracteres, con lo cual se puede asignar más peso específico a unos determinados patrones de distribución de estados de carácter en detrimento de otros, la mayor parte de los métodos de inferencia filogenética asumen la independencia de los caracteres; (2) puede existir una gran variación en la tasa de evolución bien en sitios concretos dentro de un mismo linaje o bien en sitios homólogos entre distintos linajes; (3) las bases nucleotídicas se encuentran a menudo en proporción desigual lo que puede afectar a las filogenias, siempre que las diferencias de proporciones sean distintas en los diferentes linajes. Todos estos procesos pueden interactuar haciendo aumentar la variación de la tasa evolutiva real.

3.3.3. Aproximación microevolutiva

3.3.3.1. La variabilidad genética nuclear

Para describir la variabilidad genética dentro de las poblaciones estudiadas se utilizaron diferentes parámetros: (1) el número medio de alelos por locus, medida que depende de los tamaños muestrales; (2) la proporción de loci polimórficos, que determina si un locus es polimórfico o no. Se ha elegido el criterio de 0,95 recomendado por Nei (1987) para tamaños muestrales inferiores a 50 individuos; así, se considera que un locus es polimórfico si la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0,95; (3) la heterocigosis observada (H_o) que es la proporción media de heterocigotos por locus en una población (Nei, 1987), a partir de la cual se obtiene la heterocigosis media de la población para todos los loci; y, (4) la heterocigosis esperada (H_e), es la heterocigosis teórica en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Estos parámetros se calcularon utilizando el programa estadístico BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997). Existen diferentes estudios en los que se discute cual de ellos sería el más adecuado para estimar la variabilidad genética de una población, existiendo la opinión mas o menos

extendida, de que son los valores de la heterocigosis los que mejor reflejan la totalidad de la variabilidad genética presente en una población (Vrijenhoek *et al.*, 1985; Leberg, 1990). Para comprobar si existe correlación entre el tamaño de la muestra y el polimorfismo se ha realizado una correlación de Spearman R, que es la alternativa no paramétrica al coeficiente de Pearson. La heterocigosidad esperada frente a la observada se ha comparado utilizando el test del signo, cuya única asunción que requiere es que la distribución de las variables de interés sea continua. Para realizar comparaciones entre dos grupos de estos parámetros se ha aplicado el test de U Mann-Whitney, el test no paramétrico alternativo al *t-test*, y para realizar las mismas comparaciones entre más de dos grupos se ha aplicado el análisis alternativo a la ANOVA de una vía, el test de la ANOVA de Kruskal-Wallis. Todos estos tests fueron realizados en el paquete estadístico STATISTICA/w 5.0. (StatSoft, 1995).

Debido a que los organismos están afectados por la mutación, la selección natural y por otros factores que cambian sus frecuencias génicas, la importancia de la ley de Hardy-Weinberg es básica. La cuantificación de los efectos de estos procesos tiene como punto de partida esta ley, por lo que su conocimiento es fundamental para la genética de poblaciones y los estudios de variabilidad genética (Ayala, 1994).

Para comprobar si las proporciones observadas se desvían de las esperadas, es decir, del equilibrio de Hardy-Weinberg, se llevaron a cabo tests estadísticos de *Chi-cuadrado*. Se realizaron mediante las correcciones de Lévene (1949) para tamaños de muestras pequeños. Debido a que este test no es muy fiable si las frecuencias esperadas son muy bajas, como consecuencia de la presencia de más de dos alelos en un mismo locus, entonces se realizó un segundo test agrupando todos los genotipos observados en tres clases: (1) homocigotos del alelo más común, (2) heterocigotos entre el alelo más común y uno de los otros alelos, (3) todos los otros genotipos. Además, se llevó a cabo un test que calcula las probabilidades exactas de significación. Todos los cálculos se realizaron con el programa BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997).

3.3.3.2. El flujo genético

Para analizar el flujo génico se ha utilizado los estadísticos F de Wright (1965). Estos estadísticos fueron realizados para establecer la diferenciación genética de distintas poblaciones y su posible estructuración, así como para inferir niveles y patrones de flujo genético dentro de una población. En una población que esté subdividida existen tres niveles diferentes de complejidad: el individuo (I), la subpoblación (S) y la población total (T) (Hartl, 1981; Hartl y Clark, 1989). H_i representa la heterocigosis media de un individuo en una subpoblación. H_s es la heterocigosis esperada de un individuo en una subpoblación donde los cruces entre individuos se dan al azar. Equivale, por tanto, a $2pq$. H_t representa la heterocigosis esperada si se considera que no existe una subdivisión de la población total, sino que todas las subpoblaciones están unidas y se entrecruzan con igual probabilidad. A partir de estas tres medidas de heterocigosis se calculan los tres estadísticos F de Wright:

- a) F_{st} mide la variación de la heterocigosis de las subpoblaciones debida a la fijación diferencial de alelos por deriva génica. Es el coeficiente de fijación. Es siempre superior a 0, salvo si todas las poblaciones se encuentran en equilibrio y con las mismas frecuencias alélicas, en cuyo caso sería igual a 0.

Si se considera que no existen subdivisiones dentro de la población total (H_t), F_{st} sería igual a la heterocigosis esperada total menos la heterocigosis esperada de un individuo de esa población (H_s), suponiendo que todos los cruzamientos sean debidos al azar, dividido entre la heterocigosis esperada total:

$$F_{st} = H_t - H_s / H_t$$

Un valor de F_{st} significativamente diferente de 0 indica un escaso flujo genético o en su extremo su interrupción entre las poblaciones. Si la deriva genética es la causa principal de la diferenciación genética todos los loci deberían presentar una medida comparable de F_{st} . Altos valores significativos de F_{st} en un locus podrían indicar una selección direccional mientras que bajos valores significativos se podrían deber al resultado de una selección equilibrada.

- b) F_{is} es el llamado coeficiente de endogamia. Mide la variación de la heterocigosis en los individuos de una subpoblación causada por la tendencia a que se den cruces entre individuos emparentados. Calcula la probabilidad de que los dos gametos que se unan para formar un cigoto lleven copias idénticas de un gen debido a su parentesco (Caballero, 1994). Como consecuencia de la endogamia se produce una reducción en la heterocigosis esperada en cada generación. Cuando el parámetro F_{is} es positivo indica un déficit de heterocigotos. El parámetro F_{is} viene determinado por la siguiente relación:

$$F_{is} = H_s - H_i / H_s$$

donde H_t representa la heterocigosis media de un individuo en una subpoblación y H_s la heterocigosis de un individuo en una subpoblación donde los cruces se producen al azar.

- c) F_{it} representa la variación de heterocigosis de los individuos en relación con la población total. La reducción total de heterocigosis incluye por una parte los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones (F_{is}) y los efectos de la propia subdivisión (F_{st}) por otra. Este

coeficiente viene determinado por la siguiente fórmula:

$$F_{it} = H_t - H_i / H_t$$

donde H_i sería la heterocigosis esperada de la población total en el caso de no existir ninguna subdivisión y H_i representa la heterocigosis media de un individuo en una subpoblación.

Los estadísticos F de Wright fueron calculados por medio del programa BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997) (opciones FSTAT y WRIGHT78). Esta segunda opción ofrece unas estimas de F_{st} corregidas para los componentes de la varianza. Su significación fue contrastada utilizando una aproximación no paramétrica de permutaciones con un nivel de significación de $p < 0.05$. Los cálculos fueron realizados utilizando el procedimiento de Análisis de Varianza Molecular (Excoffier *et al.*, 1992) en la opción AMOVA de ARLEQUIN v 1.1 (Schneider *et al.*, 1997). Este análisis es similar a otras aproximaciones basadas en el análisis de la varianza de frecuencias génicas, pero tiene en cuenta el número de mutaciones entre haplotipos moleculares. El programa ARLEQUIN v 1.1 (Schneider *et al.*, 1997) permitió realizar un análisis jerárquico, definiendo grupos de poblaciones, es decir, una estructura genética particular, para que sea analizada y se tengan en cuenta los distintos componentes de la varianza que reparten la variación producida entre los distintos grupos definidos, entre las poblaciones que forman esos grupos y entre el total de las poblaciones.

3.3.3.3. La variabilidad genética mitocondrial

Para caracterizar las secuencias de ADNmit a partir de las cuales se obtendrán las distancias y los distintos dendrogramas, se ha calculado la composición nucleotídica mediante PAUP* v4.0 (Swofford, 1998). Las secuencias de ADN se alinearon basándose en la secuencia de aminoácidos inferida de la ATPasa 6 y ATPasa 8. No se encontraron alineamientos ambiguos ni *gaps*. En los análisis filogenéticos se incluyeron todas las posiciones de los codones.

3.3.3.4. Las distancias genéticas

Junto con los parámetros anteriormente expuestos, las distancias genéticas sirven para estudiar las relaciones genéticas interpoblacionales. La distancia genética entre dos secuencias, individuos o *taxa* es una estima cuantitativa de lo que ambos divergen genéticamente (Avice, 1994).

A partir de los datos de electroforesis de proteínas se ha calculado (1) la distancia genética de Nei (1972), por su uso sencillo y porque es fácil compararla ya que aparece frecuentemente en la literatura, (2) la distancia de Rogers (1972) (Wright, 1978), que tiene una fácil interpretación matemática, y (3) la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) ya que incorpora unas asunciones realistas acerca de la naturaleza del cambio evolutivo en las frecuencias génicas, sin las indeseables propiedades de Nei y Rogers (Swofford *et al.*, 1996). La distancia de Nei es la más utilizada en la bibliografía y es la única que puede utilizarse para realizar comparaciones entre diferentes grupos. La distancia de Rogers representa la distancia Euclidea de las frecuencias alélicas de cada locus entre cada dos poblaciones escaladas por un factor, y asume que los cambios en las frecuencias alélicas son debidos a la deriva genética y que pueden existir cambios en el tamaño del grupo. Para el cálculo de la distancia de Cavalli-

Sforza y Edwards se incorpora una transformación de las frecuencias genéticas que hace que las varianzas de las frecuencias sean independientes de sus rangos, produciendo que la distancia sea máxima entre dos *taxa* que no compartan ningún alelo independientemente de su variabilidad (Swofford *et al.*, 1996). Estas dos últimas distancias genéticas han sido consideradas por Rogers (1986) como las más adecuadas para la construcción de árboles filogenéticos, debido a su metricidad y a que son simples medias aritméticas de las distancias entre loci, aunque reconoce que la distancia de Rogers es menos apropiada porque se ve afectada por el grado de heterocigosidad de las poblaciones. Todos estos cálculos se han hecho con el programa BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997).

A continuación se comentará con más detalle las distancias utilizadas:

- a) La distancia genética de Nei (1972) y la distancia de Nei corregida para tamaños muestrales pequeños (Nei, 1978) intentan reflejar una propiedad biológica: el número de cambios de codones que se han producido desde la separación de dos poblaciones. Esta interpretación es sólo válida si se asume que la tasa de sustituciones entre loci y entre poblaciones es constante, lo que es poco realista (Swofford *et al.*, 1996). Otro problema añadido es su falta de metricidad, y la violación de la desigualdad del triángulo (uno de los axiomas matemáticos que caracteriza una distancia métrica), por lo que a veces, al construir dendrogramas con ese coeficiente, se pueden obtener valores negativos en algunas ramas, imposibilitándose su interpretación biológica. A pesar de estos problemas, la distancia genética de Nei es el coeficiente más ampliamente utilizado, teniendo por tanto un valor comparativo muy importante.

Nei (1972) define la identidad genética (I) como:

$$I = J_{xy} / \sqrt{(J_x J_y)}$$

siendo x e y las frecuencias de un determinado alelo en las poblaciones X e Y respectivamente, y J_x , J_y , J_{xy} , las medias aritméticas entre todos los loci de Σx^2 , Σy^2 , Σxy respectivamente. La distancia corregida para tamaños muestrales (n) pequeños se obtiene reemplazando Σx^2 y Σy^2 por $(2n_x \Sigma x^2 - 1)/(2n_x - 1)$ y $(2n_y \Sigma y^2 - 1)/(2n_y - 1)$, respectivamente.

Nei (1972) define la identidad genética (I) como distancia genética (D_N) como:

$$D_N = -\ln I$$

I variará de 0 (ningún alelo es común) a 1 (las dos poblaciones poseen los mismos alelos y en idénticas frecuencias) y D_N de 0 (identidad de las poblaciones comparadas) a infinito.

- b) La distancia genética de Rogers (1972): este coeficiente no tiene un significado biológico como el anterior. Es una estima de la distancia media geométrica entre las frecuencias alélicas de dos poblaciones. No es necesario en este caso asumir la igualdad y constancia en el ritmo de evolución entre loci y poblaciones. Comparte sin embargo otro problema con el coeficiente anterior y es que se ve bastante influenciado por el grado de heterocigosis de los *taxa* (dentro del grupo). Así, la distancia entre dos *taxa* con alelos diferentes y fijados será mayor que la distancia entre dos *taxa* que tampoco compartan ningún alelo pero que presenten varios alelos por loci.

$$D_R = 1/L \sum_L \sqrt{\sum (x-y)^2/2}$$

Siendo L el número de alelos.

- c) La distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) es también muy utilizada en la literatura ya que no presenta algunas de las limitaciones de las distancias de Nei y Rogers, incorporando asunciones realistas desde el punto de vista biológico sobre la naturaleza de los cambios evolutivos que modifican las frecuencias génicas (Swofford *et al.*, 1996).

$$D_{\text{chord}} = \sqrt{((1/L) \sum_L (2\theta/\pi)^2)}$$

Siendo $\theta = \cos^{-1} \sum x_i y_i$ x_i es la frecuencia del alelo i en la población X, e y_i es la frecuencia del alelo i en la población Y.

No considera ni mutación, ni selección, ni migración, pero sí la deriva genética en los procesos de diferenciación. Incorpora una transformación angular de las frecuencias alélicas con lo que consigue que la varianza entre los valores sea proporcional al tiempo de divergencia entre poblaciones (mientras que la media será constante en ausencia de selección direccional).

En cuanto a las distancias basadas en las secuencias de ADNmit cabe decir que se ha utilizado el valor de las distancias absolutas y el valor de las distancias no corregidas. Esta última distancia se basa en un modelo de sustitución de nucleótidos que supone la misma tasa de cambio de las transiciones, por un lado, y de las transversiones, por otro (Huelsenbeck y Crandall, 1997). Es una corrección de la divergencia de las secuencias y se realiza para evitar los efectos de las múltiples sustituciones, como antes se vió, que puedan ocurrir en las tres diferentes posiciones que ocupan las bases de los codones y son consecuencia del número limitado de caracteres (son cuatro: citosina, guanina, adenina y timina) y que incrementa la posibilidad de reversión causada por múltiples sustituciones en el mismo sitio.

Estas correcciones realizadas pueden derivar de un modelo mutacional, pero son sólo correctas antes de que la saturación haya sido alcanzada, al principio de los estados de diferenciación. Además estas correcciones son fiables sólo si todos los sitios de un mismo codón evolucionan de acuerdo al mismo modelo sustitucional.

En este estudio interesa comparar diferentes grupos de distancias, para lo que se ha aplicado el test de la ANOVA de Friedman, análisis no paramétrico alternativo a la ANOVA de una vía. Siempre se han comparado las distancias de Cavalli-Sforza y Edwards y las distancias no corregidas. También interesa saber si existe correlación entre las distancias calculadas mediante los datos de electroforesis y las distancias obtenidas mediante las secuencias de ADNmit. Para ello se ha aplicado la correlación de Spearman R, alternativa no paramétrica al coeficiente de Pearson. Todo esto ha sido realizado con el programa STATISTICA/w 5.0. (StatSoft, 1995).

3.3.4. Aproximación macroevolutiva

Hasta este punto se ha abordado la resolución de los objetivos desde una perspectiva microevolutiva, y se ha estudiado la variabilidad genética dentro de diferentes grupos, poblaciones o especies; a partir de aquí se emprende la resolución desde una perspectiva macroevolutiva, que implica el estudio de la filogenia de la familia en cuestión. La comprensión de ésta ayuda a completar el conocimiento acerca de la sistemática de la familia y facilitará el proponer hipótesis que reflejen las relaciones evolutivas entre las diferentes especies y poblaciones analizadas. La utilización de caracteres moleculares con este fin ha sido muchas veces criticada por los problemas que se apuntaban anteriormente. Sin embargo, estudios de simulación mediante ordenador (Sourdis y Nei, 1988; Saitou y Imanishi, 1989; Hasegawa *et al.*, 1991) y experimentos sobre evolución de microorganismos (Hillis *et al.*, 1992) han permitido el desarrollo de modelos evolutivos cada vez más apropiados, y métodos y programas informáticos que mejoran su validez. Los métodos evolutivos pretenden alcanzar sus objetivos a través de algoritmos, secuencias específicas de pasos que conducen a la determinación de un único árbol, y/o de criterios óptimos, que comparan unas filogenias (varios árboles filogenéticos) con otras y deciden cual/es es/son mejor/es (Swofford *et al.*, 1996). Se han desarrollado muchos y diferentes métodos para la construcción de filogenias moleculares (Swofford, 1998; Nei, 1996). La eficacia de cada uno de los métodos en reconstruir la historia evolutiva de los caracteres moleculares es un objeto de controversia actualmente y depende de varios factores, como pueden ser, entre otros, la magnitud de la divergencia entre los *taxa* que se están comparando y la existencia de diferentes tasas evolutivas en las distintas ramas del árbol; en definitiva, depende de lo que el modelo de evolución elegido se ajuste a las condiciones concretas que cada método filogenético asume (Nei, 1991, 1996). A pesar de todo, y en general, los métodos de los que se dispone en la actualidad son efectivos a la hora de determinar las relaciones filogenéticas moleculares bajo un amplio margen de condiciones evolutivas (Hillis *et al.*, 1994).

Para conocer la solidez de los árboles inferidos han de tenerse en cuenta dos tipos de errores que explican las desviaciones de un parámetro de la población respecto a las estimas de ese parámetro, son el error aleatorio y el error sistemático. El primero es debido estrictamente al tamaño de la muestra utilizado para hacer la estima. Por definición, el error aleatorio desaparece con muestras infinitas, pero esto no es realista, así que para maximizar la extracción de información filogenética y para calcular el soporte estadístico de los nodos existen métodos muy eficientes como son los no paramétricos *bootstraps* y *jackknife* (Efron, 1982; Efron y Gong, 1983; Efron y Tibshirani, 1993), que permiten estimar la varianza de un estadístico de la distribución de las muestras que es, o bien desconocido, o bien difícil de obtener, y el método de las probabilidades posteriores bayesianas (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Lewis, 2001) Más adelante

se profundizará en el *bootstraps* y en las probabilidades posteriores que son los utilizados en este estudio. En contraste, el error sistemático es consecuencia de realizar asunciones incorrectas en el método estimado comentadas en el párrafo anterior, es decir, este error se produce cuando el proceso evolutivo viola las asunciones del método filogenético elegido. La violación de la asunción de que todos los caracteres estudiados son heredados conduce a un error sistemático, pero en este estudio esto no supone el problema, por el tipo de datos que se manejan. Lo que sí supone una dificultad es la violación de la asunción de la independencia de caracteres por parte de los datos aloenzimáticos, premisa que deben cumplir los caracteres utilizados en las reconstrucciones filogenéticas (Hennig, 1966), ya que las frecuencias alélicas en un locus determinado deben sumar 1. Además parece ser que el uso de las frecuencias alélicas es criticado a menudo porque se modifican fácilmente por deriva génica y/o selección, y por lo tanto no proporcionan una información sólida para los análisis filogenéticos (Mickeyevich y Johnson, 1976; Buth, 1984). Crother (1990) también cuestiona la relevancia de las frecuencias alélicas en la filogenia, ya que hay evidencias suficientes para saber que varían temporalmente en el transcurso de unos pocos años, solapándose los cambios y perdiendo información. Aunque según Swofford *et al.* (1996) proporcionan al menos información sobre la presencia o ausencia de determinados alelos, y esto se ha aplicado en algunos estudios de sistemática molecular siendo la presencia/ausencia de los alelos uno de los métodos más utilizados. Existe alguna técnica que ayuda a identificar el error sistemático, y varias estrategias (más o menos discutidas) para evitarlos. Así, se puede (1) realizar un cambio de las asunciones, (2) intentar disminuir la longitud de las ramas, (3) eliminar los datos que no sean sólidos y/o (4) dar más peso a los datos más relevantes, asignando menos pesos a esos caracteres que o bien violan las asunciones de un método o bien predisponen al método hacia la inconsistencia.

Los métodos existentes para reconstruir filogenias a partir de datos moleculares se pueden dividir en: métodos cuantitativos o basados en distancias y métodos cualitativos o basados en caracteres, de acuerdo con el tipo de datos usados para la reconstrucción. Es importante distinguir entre información cualitativa y cuantitativa por dos razones fundamentales: (1) muchas aplicaciones biológicas requieren marcadores genéticos cualitativos (identificación forense, determinación de parentales, estimación de flujo génico, y la caracterización de híbridos), mientras que otras aplicaciones, como la estima filogenética, pueden emplear bien información cualitativa o cuantitativa; (2) algunos algoritmos filogenéticos requieren datos cualitativos, mientras que otros utilizan matrices de distancias genéticas. A continuación se detallarán las distintas aproximaciones que se han tenido en cuenta para realizar las inferencias filogenéticas. El criterio de elección se debe, entre otras, a su mejor adaptación a los datos moleculares utilizados.

3.3.4.1. Métodos basados en distancias

Los métodos cuantitativos o basados en distancias han sido considerados frecuentemente métodos fenéticos, de ahí que a los dendrogramas elaborados a partir de ellos se les denominen fenogramas. Sin embargo, este término se presta a error, ya que se parte de datos genéticos y el término “fenética”, clasificación basada sobre el grado de similitud de los organismos examinando sus caracteres fenotípicos, evoca normalmente caracteres morfológicos. Aunque el propósito de la escuela fenética es encontrar semejanzas y no inferencia filogenética alguna,

varios de los análisis fenéticos son utilizados por las escuelas cladísticas o evolutivas para realizar reconstrucciones filogenéticas (Machordom, 1992). De hecho, imponiendo ciertas restricciones como la consideración de una tasa de mutación constante en el tiempo, algunos autores demuestran que tratamientos de este tipo permiten establecer reconstrucciones filogenéticas (Farris, 1972; Bullini y Sbordonì, 1980; Bonhomme *et al.*, 1984; Faith, 1985; Nei, 1986). Las reconstrucciones filogenéticas utilizando este tipo de métodos se obtienen determinando, en primer lugar, las distancias genéticas entre pares de unidades taxonómicas operativas (UTOs), que pueden ser una especie, una población, un conjunto de individuos, etc., obtenidas bajo un modelo concreto de evolución.

Una vez obtenidos los valores de divergencia se emplean distintos métodos de reconstrucción filogenética; algunos de estos métodos realizan la reconstrucción bajo el supuesto de que el valor de divergencia obtenido es proporcional al tiempo transcurrido desde su separación de un antecesor común, es decir, asumiendo que la molécula se comporta como un reloj molecular. Bajo este supuesto, se realizaron reconstrucciones filogenéticas utilizando el método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) (Sneath y Sokal, 1973) para los datos aloenzimáticos. Es un método puramente algorítmico y conceptualmente simple. En este estudio se ha partido de las matrices de las distancias genéticas de Rogers (1972) y de las de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). Con ello se pretende comparar los dendrogramas obtenidos a partir de coeficientes de distancias que tienen propiedades diferentes. Éstas son matrices de distancias entre todos los pares de unidades taxonómicas. El dendrograma se comienza a construir con las dos UTOs que tengan las distancias genéticas menores, añadiéndose subsecuentemente las demás UTOs. Cuando dos UTOs se unen dejan de ser identidades individuales para formar un agrupamiento, el proceso se completa cuando se construye un único agrupamiento que contiene todos las UTOs originales. El cálculo de las distancias entre las dos primeros UTOs que forman el agrupamiento 1 sería igual a su distancia genética dividida entre el número de miembros de cada agrupamiento. En el siguiente agrupamiento, el 2, la distancia entre sus miembros se calcularía sumando las distancias entre cada uno de ellos, dividido entre el número de miembros de cada agrupamiento (Swofford *et al.*, 1996). A pesar de su sencillez, suele reconstruir bien las relaciones filogenéticas entre *taxa* porque reduce el error al que están sometidas las estimas de divergencia cuando éstas son altas (Nei, 1987).

El método UPGMA asume un ritmo constante en el proceso evolutivo, por lo tanto, si la medida de distancias no está sujeta a errores estocásticos, los fenogramas serán árboles con topologías y longitud de ramas correctas. La asunción más restrictiva que tiene este método de clasificación es que requiere que los datos sean ultramétricos. Filogenéticamente, las distancias ultramétricas proporcionan un árbol en el que las distancias entre cualquiera de las dos UTOs es igual a la suma de las ramas que las unen y que se puede enraizar para que todas las UTOs equidisten de la raíz (Swofford *et al.*, 1996). Los árboles aditivos asumen que la suma de la longitud de las ramas entre dos UTOs (y la longitud total del árbol) tiene un significado biológico real.

Con el fin de obtener una robustez en los resultados de las reconstrucciones realizadas por el método UPGMA se realizó un análisis por uniones ajustadas o *bootstraps*. La técnica consiste

en crear un nuevo conjunto de datos a partir de los originales, al azar y con reemplazamiento por lo que el conjunto de datos que resulta tiene el mismo tamaño que el original, pero algunos caracteres pueden no estar presentes o estar duplicados. A partir de cada réplica se construye un árbol filogenético utilizando el método de reconstrucción que se ha utilizado con la matriz original. Este método permite determinar el número de veces que un grupo particular de UTOs aparece en el árbol de forma que la variación entre las distintas réplicas proporciona una estima del error de la reconstrucción original, permitiendo analizar estadísticamente la variación al azar de los resultados obtenidos y conocer el error aleatorio. Valores de *bootstraps* de 70% o superiores han sido atribuidos por algunos autores a una probabilidad de más del 95% de que el agrupamiento sea real (Hillis y Bull, 1993). El nivel de aceptación en este estudio se ha fijado en el 50%, es decir, también se manejan agrupaciones que aparecen con una frecuencia inferior al 70% en tanto continúen resolviendo el árbol y no contraríen grupos más frecuentes.

Todas las operaciones realizadas para la obtención del dendrograma a partir de las distancias de Rogers (1972) han sido realizadas con el programa de ordenador BIOSYS-2 (Swofford *et al.*, 1997). Debido a que este programa no está dimensionado para hacer *bootstraps* con el número de poblaciones con las que se trabaja, se ha recurrido a varios programas del paquete PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993) para hallar la robustez de los nodos del dendrograma generado a partir de las distancias de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967): SEQBOOT, que prepara las matrices para los *bootstraps* proporcionando el número de réplicas que se requiere; GENDIST, que calcula la distancia genética de cuerda de Cavalli-Sforza (1967); NEIGHBOR, que desarrolla el método de agrupamiento UPGMA; y CONSENSE, que proporciona un árbol consenso de todos los árboles máximo verosímiles obtenidos a partir de esas matrices).

Sin embargo, si los datos no se comportan siguiendo un reloj molecular, las reconstrucciones obtenidas podrían no ser correctas por lo que, partiendo de los datos de secuencias del ADNmit se ha utilizado un método de análisis que no asume tasas homogéneas de evolución: el método del vecino más próximo (*Neighbor-Joining*) (Saitou y Nei, 1987). Este método utiliza un algoritmo semejante al UPGMA, cuyo objetivo es encontrar pares de *taxa* que minimizan la longitud total del árbol, es el principio de mínima evolución. En cada paso del análisis se construye una matriz de distancias transformadas que tiene el efecto de ajustar la longitud de las ramas entre cada par de nodos teniendo en cuenta la divergencia media del resto de los nodos. Además de no asumir uniformidad en cuanto a la tasa de evolución entre las distintas ramas del dendrograma, es capaz de construir un árbol aditivo sin asumir la ultrametricidad de los datos.

La estima anteriormente comentada fue desarrollada con PAUP* v4.0 (Swofford, 1998). El modelo utilizado fue HKY+G. Los errores estándar se calcularon mediante *bootstraps* con 1000 réplicas. De nuevo, el nivel de aceptación en este caso está fijado en el 50%.

3.3.4.2. Métodos basados en caracteres

En el caso de los métodos basados en caracteres, las relaciones entre las UTOs se establecen teniendo en cuenta cada uno de los caracteres de los que se tiene información, sin necesidad de

reunirlos en un único valor de distancia, punto criticado por los cladistas para los tratamientos anteriores “fenéticos”. Así, cada alelo de un locus y cada nucleótido de la secuencia serían un estado de carácter. Los métodos basados en caracteres tienen un principal punto criticable por parte de los fenéticos: el efecto de las homoplasias sobre la construcción filogenética.

Existen tres metodologías principales en la reconstrucción filogenética basada en caracteres: métodos de máxima verosimilitud, inferencia bayesiana y métodos de máxima parsimonia.

3.3.4.2.1. Método de máxima verosimilitud

El método de máxima verosimilitud es un método complejo que construye un cladograma con la topología con el valor más alto de probabilidad, bajo un modelo de evolución determinado. Originariamente se utilizaba como modelo la teoría del movimiento Browniano, y asumía una distribución de Gauss para la variación evolutiva de los genes (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967). Posteriormente se demostró que este tipo de variación no se distribuía normalmente según la distribución de Gauss sino que se ajustaba mejor a una distribución de Poisson. Así, Felsenstein (1981) desarrolló algoritmos de máxima verosimilitud para construir árboles filogenéticos completos, asumiendo que cada carácter cambia independientemente por deriva génica en ausencia de nuevas mutaciones. Cabe señalar que este método no asume un reloj molecular. Las unidades de longitud de las ramas representan el número esperado de cambios de los estados de carácter, o sea, es más probable que se hayan producido más cambios en las ramas largas que en las cortas. El árbol se enraiza para darle una dirección evolutiva o polaridad. Se deben interpretar los árboles que resultan con precaución, ya que si las asunciones no son las correctas, es decir, si las frecuencias génicas o las secuencias cambian no solamente por deriva genética, sino también por mutación, entonces el modelo no es correcto.

Suponiendo, además, que todos los sitios tienen la misma tasa de evolución, el método permite determinar tanto la mejor topología como las longitudes de las ramas (en número esperado de sustituciones nucleotídicas) que mejor ajustan el modelo especificado a los datos experimentales obtenidos, siendo estos parámetros los que hacen máxima la función de verosimilitud determinada para el modelo.

Para la aplicación de este método con los datos aloenzimáticos fue necesario la utilización de tres programas del paquete PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993): (1) SEQBOOT (que proporciona un número de matrices réplicas obtenidas por el muestreo de los sitios de restricción originales); (2) CONTML (que intenta hallar el árbol más verosímil con adiciones y reordenaciones, de modo que en la longitud de sus ramas se recojan todos los cambios evolutivos de acuerdo al modelo evolutivo escogido explicado anteriormente), y CONSENSE (que proporciona un árbol consenso de todos los árboles máximo verosímiles obtenidos a partir de esas matrices). Con los datos aloenzimáticos se ha determinado la fiabilidad de los árboles obtenidos mediante métodos de *bootstraps* (Felsenstein, 1985).

Para la aplicación de este método con las secuencias del ADNmit se utilizó el programa PAUP* v4.0 (Swofford, 1998). En este caso también fue posible determinar la robustez de las agrupaciones obtenidas por el procedimiento de *bootstraps* con 1000 replicas. De nuevo, el nivel de aceptación en este caso está fijado en el 50%. Como se ha mencionado anteriormente, para conocer el modelo de sustitución al que se ajustan las secuencias utilizadas en este estudio, se ha utilizado el programa MODELTEST 3.0 (Posada y Crandall, 1998), que seleccionó el modelo HKY+G como al que mejor se ajustan las secuencias obtenidas para el género *Profundulus*.

3.3.4.2.2. Inferencia bayesiana

La inferencia Bayesiana de una filogenia molecular está basada en el cálculo de la probabilidad posterior de un árbol, es decir, la probabilidad de que dicho árbol sea el correcto (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Lewis, 2001). Para calcular la probabilidad posterior de un árbol se utiliza el Teorema de Bayes, que combina la probabilidad previa de una filogenia con su verosimilitud.

El cálculo de la probabilidad posterior implica evaluar todos los posibles árboles y para cada árbol, investigar todas las posibles combinaciones de longitud de rama y parámetros de modelo. No se puede realizar tal estima analíticamente, pero sí obtener una aproximación de la probabilidad posterior mediante el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Yang y Rannala, 1997; Larget y Simon, 1999). Se trata de realizar una simulación estocástica para obtener muestras de la distribución posterior. El proceso parte de un árbol al azar, es decir, una combinación específica de topología, longitud de ramas y valores de parámetros de modelo. La cadena de Markov comienza sus visitas con una generación en la que se modifica ligeramente una de las variables y se compara la probabilidad posterior original. Si el cambio supone mejorar el valor de probabilidad se acepta directamente. Si el cambio implica un peor valor de probabilidad, el cambio puede o no rechazarse. Para ello, se determina si el *ratio* entre las probabilidades de combinación inicial y la actual es superior o no a un valor al azar, es decir, se determina si el cambio a la baja en probabilidad es mínimo o significativo. Si el cambio es mínimo, se acepta y si por el contrario es un cambio sustancial se rechaza. El proceso continúa de esta manera a lo largo de varias generaciones, de tal manera que al final, la cadena de Markov realiza una aproximación de la distribución posterior (los árboles son visitados en función de la probabilidad posterior). Al final, se pueden tener en cuenta todas las generaciones o simplemente una muestra de ellas. La probabilidad marginal de un árbol es la proporción de veces que dicho árbol aparece en la cadena.

Es importante tener en cuenta que la aproximación será más exacta cuantas más generaciones se incluyan en cada cadena y si se eliminan las generaciones iniciales (*burn-in*), ya que la cadena empezó al azar. Como en las búsquedas heurísticas, una búsqueda MCMC puede caer en un mínimo local, para evitarlo se corren simultáneamente varias cadenas a la vez. Sólo una de ellas cuenta para el resultado final, la cadena “fría”. El resto son cadenas “calientes” que ayudan a evitar que la cadena “fría” quede atrapada en un mínimo local. Las cadenas “calientes”, a diferencia de la “fría”, elevan la probabilidad posterior de un árbol a una potencia entre 0 y 1, lo que supone favorecer el salto entre picos de probabilidad (*Metropolis-coupled*

MCMC; MCMCMC). Durante el proceso de búsqueda, se producen cruces entre las cadenas teniendo en cuenta los criterios arriba mencionado para visitar nuevos árboles en el espacio de probabilidad posterior.

La inferencia Bayesiana para la filogenia de la familia Profundulidae realizada en este estudio ha sido desarrollada con el programa Mr. BAYES 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) simulando una cadena de Markov para 1000000 de ciclos, a partir de las secuencias de los genes que codifican para las ATPasas 6 y 8.

3.3.4.2.3. Métodos de máxima parsimonia

De entre los métodos de inferencia filogenética basados en caracteres, los más utilizados son los basados en el principio de máxima parsimonia. Se fundamentan en el principio de simplicidad por el cual se admite la hipótesis que pueda explicar los datos de la forma más sencilla, seleccionando aquellos árboles que necesiten un menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas. Esencialmente sostienen que las hipótesis más simples son preferidas a las más complicadas y que las hipótesis *ad hoc* (las asunciones de homoplasia, convergencia, paralelismo y reversiones) han de evitarse siempre que sea posible. Para ello existen varios algoritmos, cada uno de los cuales parte de diferentes supuestos respecto a cómo tiene lugar la transformación de los caracteres:

- a) Parsimonia de Wagner (Fitch 1971; Farris, 1979). Permite la libre reversibilidad de los estados de los caracteres, es decir, asumen que la probabilidad de transformación del estado 0 al 1 es la misma que la transformación del estado 1 al 0. Apenas ofrecen impedimentos en los cambios permisibles de estado de carácter. La parsimonia de Wagner, formalizada por Kluge y Farris (1969) y Farris (1970), asume que cualquier transformación de un estado de carácter a otro también implica una transformación a través de los estados intermedios, definidos por una relación de orden. Esto es apropiado para caracteres binarios, multiestado ordenados y continuos. Fitch (1971) generalizó el método para permitir los caracteres multiestado no ordenados; tolera, por lo tanto, que cualquier estado se transforme directamente a otro estado. Ambos métodos permiten una libre reversibilidad, es decir, asumen que los cambios de los estados de carácter en cualquier dirección son igualmente probables, y que los estados de carácter pueden transformarse de uno a otro y viceversa. Una consecuencia de la reversibilidad es que el árbol puede estar enraizado en cualquier punto sin que cambie su longitud.
- b) Parsimonia de Dollo (Farris, 1977). Método surgido como consecuencia de la asimetría, DeBry y Slade (1985) de los cambios de estados de carácter ya que para determinados caracteres como es el caso de los sitios de restricción, la pérdida de un sitio de restricción es más probable que la ganancia paralela en una posición particular. Según este criterio, la probabilidad de aparición de un estado derivado es mucho menor que la desaparición de éste. No es muy razonable asumir que las probabilidades de cambio de carácter son simétricas. Puede ser aplicado a caracteres binarios o a caracteres multiestado linealmente ordenados para los cuales se puede perfectamente hipotetizar una condición ancestral (polaridad), y

sostiene que el origen de un carácter es único y la presencia de homoplasias en un estado ancestral se explica por reversiones.

- c) Parsimonia de Camin-Sokal (Camin y Sokal, 1965). Este método fue la primera aproximación de parsimonia para caracteres discretos. Realiza una asunción poco justificable: que la evolución es irreversible. Según este criterio, no se permite que un estado derivado para un carácter vuelva a su condición ancestral. Se ha utilizado generalmente para caracteres morfológicos.

Todas las variantes de la parsimonia pueden resumirse en el método de la parsimonia generalizada, que permite asignar un coste determinado para la transformación de un estado de carácter a otro, facilitando la consistencia de los árboles generados con las asunciones que el investigador crea conveniente, y éste es el método que se ha utilizado en este estudio.

En general, los métodos de parsimonia para inferir filogenias actúan seleccionando los árboles con longitud total mínima, minimizando de este modo el número de pasos evolutivos (transformación de un estado de carácter a otro) que se requiere para explicar el conjunto de datos observado.

A partir de cierto número de caracteres y/o de UTOs, el número de árboles filogenéticos que se pueden construir es enorme y para limitarnos a aquellos en los que la filogenia se explica desde un punto de vista más parsimonioso, se suelen utilizar distintos algoritmos (exhaustivos, *branch-and-bound* y heurísticos) que buscan los árboles más óptimos. El más correcto es la búsqueda exhaustiva, que evalúa todos los nodos de todos los árboles uno por uno, pero este método no es operativo cuando se cuenta con una cantidad elevada de UTOs para ordenar como sucede en el caso que se trata. Para ello hay otro algoritmo, el método "*branch-and-bound*" (Hendy y Penny, 1982), que se parece mucho a la búsqueda descrita anteriormente, aunque difiere de la misma en que elimina las partes que no contienen soluciones óptimas. Este método utiliza primero una aproximación heurística para obtener un árbol óptimo cuya longitud es utilizada como el límite superior para detener las siguientes búsquedas cuando este valor se supere. Si el conjunto de datos es muy grande para permitir el uso de los métodos exactos, es preferible utilizar las aproximaciones heurísticas que sacrifican la garantía de optimalidad reduciendo el tiempo de cálculo. El proceso comienza utilizando un árbol inicial que se reordena para mejorar su longitud en función de un criterio de optimización elegido. Cuando no se puede mejorar más se para la búsqueda, sin saber si se ha llegado a un óptimo global o local. Una manera de evaluar el éxito de la elección del método es comenzar la búsqueda con diferentes árboles para comparar los resultados.

Así, se realiza una primera estima de la filogenia a partir de los datos de frecuencias alélicas, mediante un método de parsimonia basado en una modificación del método de Wagner. Para ello se empleó el programa FREQPARS 1.0 (Swofford y Berlocher, 1987) que tiene como objetivo encontrar el árbol que muestre el cambio mínimo posible en la frecuencia de cada alelo. Al mismo tiempo se asegura que las frecuencias alélicas en el ancestro hipotético sumen 1, lo que se conoce como el requerimiento de aditividad. Posteriormente, busca entre el

conjunto de todas estas topologías el árbol particular que proporciona la longitud de árbol más corta, a través de una búsqueda heurística. Los propios autores advierten que el programa tiene algunas limitaciones: así, la parte de la búsqueda del árbol más parsimonioso no es muy eficiente y es muy difícil encontrar el árbol más corto cuando se tiene un gran número de UTOs y caracteres. En este método también se enraizó el árbol para darle una dirección evolutiva o polaridad.

Posteriormente se realizaron dos estimas más de máxima parsimonia (Fitch, 1977). Una a partir de las frecuencias alélicas y otra, a partir de las secuencias de ADNmit de los genes que codifican para la ATPasa 6 y ATPasa 8, con el propósito de complementar las ventajas de ambas metodologías. Esta vez se utiliza el programa PAUP* v4.0 (Swofford, 1998). En el caso de las frecuencias alélicas y para cada locus polimórfico, se utilizó una matriz de distancias de Manhattan entre todos los pares de *taxa*. La matriz de distancia genética de un solo locus es, por lo tanto, un valor con peso de la matriz de pasos, en el cual cada locus es considerado como un carácter (Berlocher y Swofford, 1997).

Para realizar los análisis cualitativos es necesario, en primer lugar, transformar las frecuencias alélicas en caracteres discretos que puedan ser comparados. La definición de los caracteres se plantea considerando a un locus como carácter multiestado y a las combinaciones alélicas como caracteres de estado, así se evita el problema que pueda plantear la violación de la asunción de independencia de caracteres, ya que los alelos de un mismo locus no son realmente independientes y sí lo son los distintos loci o genes. Y para definir la relación u orden entre los diferentes estados de caracteres, la codificación de los datos alozimáticos sigue la metodología comparativa de matrices de pasos de Mabee y Humphries (1993) y las recomendaciones de Mardulyn y Pasteels (1994) para alelos múltiples. Estos autores proponen utilizar una matriz por pasos en la que figuren todas las posibles combinaciones alélicas, asumiendo que todos los estados de carácter no observados pueden estar presentes en los *taxa* ancestrales. Creando, por lo tanto, nuevos estados de carácter basados en los estados observados en los *taxa* actuales, que son útiles en el análisis de parsimonia y que pueden estar presentes en los *taxa* ancestrales. Así se evita que se dé la posibilidad de que los *taxa* ancestrales no presenten algunas de las combinaciones alélicas observadas y, por lo tanto, no se encuentre el árbol más parsimonioso. Los cálculos de las matrices de paso fueron realizados con el programa PAUP* v4.0 (Swofford, 1998).

Para las secuencias de ADNmit, el algoritmo de este método consiste en considerar una topología particular para un grupo de UTOs e inferir cuáles son las secuencias más antiguas para esta topología. Seguidamente se calcula el número mínimo de sustituciones necesarias para explicar los cambios existentes entre las secuencias más antiguas y las más modernas. Una vez obtenido este número, se repite el proceso con una nueva topología. Cuando todas las topologías razonables han sido ensayadas se elige aquella que requiere el mínimo número de sustituciones. Este método no permite estimar la longitud de las ramas.

En los dos casos se obtiene la tipología de los árboles utilizando el método de Wagner y para hallar el árbol más parsimonioso, el método heurístico. Como anteriormente se comentó, el

modelo de sustitución al que mejor se ajustan las secuencias de ADNmit utilizadas en este estudio, es el modelo HKY+G. La estimación del nivel de confianza de la inferencia de la filogenia se calcula mediante *bootstraps* con 1000 réplicas y el nivel de aceptación vuelve a estar fijado en el 50%.

3.3.4.2.4. Comparación y efectividad de los diferentes métodos

La eficiencia de los diferentes métodos puede ser comparada determinando su fiabilidad a la hora de recuperar la topología correcta y estimando las longitudes de las ramas de un árbol modelo simulado por el ordenador (Tateno *et al.*, 1982; Nei *et al.*, 1983; Sourdis y Krimbas; 1987).

De entre los métodos de matrices de distancia, el del vecino más próximo es el más versátil y eficiente, con independencia del número de sustituciones de nucleótidos por sitio de la secuencia. El método del vecino más próximo tiene la principal ventaja de que es rápido. Su principal desventaja es que cuando se transforman las secuencias en distancias se pierde información, y puede ser difícil obtener unas estimas fiables de secuencias divergentes (Holder y Lewis, 2003).

Cuando el ritmo de sustitución génica es constante y el número de sustituciones por sitio es bajo, el método idóneo es el de distancias de Wagner (Farris, 1972). Lo mismo sucede cuando el número de sustituciones es grande y la velocidad de sustitución varía entre los linajes evolutivos.

Sin embargo, generalizando, cuando el número de sustituciones es relativamente grande, el método a escoger es el UPGMA. Tateno *et al.* (1982) sostienen que, en general, el método de Farris tiende a sobreestimar la longitud de las ramas siendo el UPGMA el mejor método para estimar las longitudes de las ramas, debido a que la estimación de las distancias genéticas está sujeta a grandes errores estocásticos, y el procedimiento de hallar distancias medias del UPGMA reduce el efecto de este error en la estimación de las longitudes de las ramas.

Por otro lado, el método de máxima parsimonia es lo suficientemente rápido para realizar el análisis de cientos de secuencias. Los resultados que ofrecen son robustos, siempre que las ramas sean cortas (secuencias estrechamente relacionadas). Si hay una gran variación en la longitud de las ramas, puede funcionar mal (Holder y Lewis, 2003). Al comparar el método de máxima parsimonia con los de matrices de distancias, asumiendo un ritmo evolutivo constante y un número pequeño de sustituciones por sitio, se observó que el método que con mayor probabilidad recuperaba la topología correcta era el primero. Sin embargo, es de destacar que el método de parsimonia sólo es fiable si se examina un número grande de nucleótidos. Así, cuando se usa ADNmit como fuente de secuencias y se conoce un organismo claramente distinguible del resto, se necesitan al menos 2600 nucleótidos para determinar el árbol correcto. Cuando se usan genes nucleares esta cifra es mucho mayor, dado que la velocidad de sustitución de nucleótidos es menor. Este método deja de ser fiable cuando las secuencias analizadas son lo

suficientemente lejanas como para acumular fenómenos de paralelismo y reversión, siendo entonces más fiables el método de distancias de Wagner, la modificación de Farris del UPGMA (Saitou y Nei, 1986) o el método del vecino más próximo, utilizado en este estudio. Si el número de los cambios actuales en la secuencia de una macromolécula es siempre pequeño, entonces la parsimonia reconstruirá correctamente la filogenia, siempre que se den los suficientes datos (Felsenstein, 1978a). Cuando el número de cambios incrementa, la proporción de esos cambios que son homoplásticos (paralelismos, convergencias o reversiones) aumenta. Si la longitud de las ramas es lo suficientemente corta para que el número esperado de cambios en una rama sea pequeño, estos cambios homoplásticos serán más fácilmente detectados como tales (Felsenstein, 1978b). En la construcción de árboles de máxima parsimonia, no todos los sitios de una secuencia son útiles para la determinación de una topología. Sólo son informativos aquellos sitios en los que, a lo largo de su evolución, existen al menos dos clases diferentes de nucleótidos, cada una representada, al menos dos veces. Esto supone que cuando el número de sustituciones por sitio es pequeño, y el número de UTOs usado también, gran parte de las mutaciones contempladas son únicas, y por lo tanto no informativas para construir un árbol de máxima parsimonia. Esta es su principal desventaja con respecto a los métodos de matrices de distancias genéticas. El principal problema de este método surge al calcular la probabilidad de que en un sitio un nucleótido sea sustituido por otro, y es que esta probabilidad no es uniforme, sino que depende de su posición en una zona más o menos conservada de la secuencia de ADN.

El método de máxima verosimilitud es, en general, más eficiente que el método de máxima parsimonia, y en particular, cuando el ritmo de sustitución es variable. La máxima parsimonia no tiene en cuenta la longitud de las ramas y esta diferencia explica la consistencia de la máxima verosimilitud en muchas situaciones en que la parsimonia es inconsistente. Sin embargo, es ligeramente menos eficiente que el método del vecino más próximo. La eficiencia de este método depende directamente del modelo de probabilidad escogido (Saitou e Imanishi, 1989). Una de las ventajas del método de máxima verosimilitud sobre el de máxima parsimonia es que es más robusto a las violaciones de las asunciones de los modelos que utiliza que los métodos de árboles aditivos (Hulsebeck, 1995). En este método, la longitud de las ramas de los árboles obtenidos representa el número esperado de cambios de los estados de carácter, por lo tanto, los cambios son más probables que sucedan a lo largo de las ramas largas que de las ramas cortas. El método de verosimilitud presenta como desventaja que sus estimas, acerca de la cantidad de los cambios evolutivos, infravaloran la verdadera cantidad de cambios, a no ser que la tasa actual de cambio sea extremadamente pequeña. Esto se debe a que es incapaz de detectar la superposición de los cambios en la misma posición de la secuencia genética: los cambios en un sitio particular a lo largo de la línea de una filogenia pueden ocultar cambios más antiguos en el mismo sitio; y cambios convergentes y paralelos pueden ocurrir en mismos sitios en diferentes líneas. El método de verosimilitud explicado anteriormente elige la hipótesis que maximiza la probabilidad de observar los datos que se han obtenido. Para calcular esta probabilidad se necesita un modelo de cambio evolutivo y la longitud de las ramas representa el número esperado de cambios de estados de carácter a lo largo de una rama, cuando una rama es corta, hay una relativa baja probabilidad de que un solo cambio ocurra a lo largo de la rama, y una probabilidad ínfima de más de un cambio. En resumen, mientras que la parsimonia ignora información de la longitud de las ramas cuando se evalúa un árbol, la máxima verosimilitud considera que los cambios son más probables a lo largo de las ramas largas que de las cortas, una estimación de las longitudes de las ramas es un componente importante de este método. La

diferencia explica la consistencia de la máxima verosimilitud bajo muchas situaciones en las que la parsimonia es inconsistente. La principal desventaja que presenta es que puede ser muy lento, dependiendo de la minuciosidad de la búsqueda y el acceso a los recursos computacionales (Holder y Lewis, 2003).

Por último, cabe señalar la principal ventaja que presenta la inferencia bayesiana, método que tiene una estrecha relación con el método de máxima verosimilitud, y es que el uso de las probabilidades posteriores es una mejor manera de asignar soporte a los árboles que con la utilización de *bootstraps*. La principal desventaja es que se deben asignar los parámetros de la distribución *a priori*. Además puede ser difícil determinar si la aproximación MCMC se ha ejecutado durante el tiempo suficiente (Holder y Lewis, 2003).

3.3.5. El reloj molecular

En este estudio se aplica la sistemática molecular para estimar el tiempo de diferenciación entre *taxa* cuyo conocimiento es importante a la hora de contrastar hipótesis acerca de la correlación de eventos evolutivos e historia geológica, y también permite aproximarse al conocimiento de la naturaleza, eficacia y tiempo en el que se creó una barrera extrínseca cuyo resultado fue la especiación geográfica. Para ello se utiliza la medida de divergencia molecular. Este método está basado en la hipótesis del reloj molecular, desarrollada originalmente por Zuckerkandl y Pauling (1965), que se fundamenta en la teoría neutral de mutación (Kimura, 1968). Esta teoría presupone que la casi totalidad de las mutaciones producidas en las secuencias nucleotídicas del ADN, no suponen ningún cambio en los organismos que las han sufrido, y que las tasas de evolución son constantes. El concepto de un reloj molecular se ajusta bien con la teoría de la neutralidad porque asume que la tasa de evolución neutral en las secuencias genéticas es igual que la tasa de mutación de los alelos neutrales. Básicamente, Zuckerkandl y Pauling (1962, 1965) consideran que las mutaciones aumentan a una tasa predecible y regular. Está comúnmente aceptado la existencia de una relación entre el tiempo de divergencia de dos *taxa* y su diferenciación molecular (Thorpe, 1982) y la mayor parte de los biólogos reconocen la relación positiva entre la diferenciación molecular y el tiempo. Sin embargo, la asunción de la linealidad de las relaciones (Zuckerkandl y Pauling, 1965) para diferentes escalas de tiempo y para diferentes *taxa* y moléculas están bajo constante revisión (Bermingham *et al.*, 1997), y está admitida la ausencia de modelos generales que puedan aplicarse entre diferentes organismos (Hillis *et al.*, 1996). En este estudio, asumiendo la existencia de esta relación, se aplica la hipótesis del reloj molecular para realizar una estima aproximada de la divergencia entre *taxa* monofiléticos (Fernández Perdiges, 1997).

A parte de la asunción de la función de linealidad de los cambios moleculares con el tiempo, un reloj molecular perfecto asume una misma tasa de cambio en todas las posiciones de las moléculas y en todas las secuencias homólogas de los distintos linajes; una construcción sin error del árbol filogenético a partir de los datos moleculares y, por lo tanto, la posibilidad de realizar un análisis independiente de cada rama del árbol; la reconstrucción sin error de las sustituciones a lo largo de cada linaje; el conocimiento sin error de los tiempos de divergencia;

y la posibilidad de construir una regresión entre el tiempo y el número de sustituciones. Pero estas asunciones no son nada realistas (Hillis *et al.*, 1996).

Algunos autores han mantenido que el reloj molecular puede ser calibrado universalmente entre los diferentes grupos de organismos ya que han oscilado de la misma manera en eubacterias, en animales y en plantas. Esta conclusión ha sido apoyada por Wilson *et al.* (1987) con el siguiente razonamiento: la mayor parte de las sustituciones nucleotídicas involucran mutaciones neutrales; la tasa de mutación por unidad de tiempo es más elevada en los organismos de corta generación; la fracción de mutaciones que es efectivamente neutral es más baja en las poblaciones con más efectivos; y las especies con generaciones cortas tienden a tener poblaciones mayores. Por lo tanto una tasa de mutación mayor en especies de corta generación es contrarrestado por una fracción baja mutaciones efectivas, por lo que la tasa evolutiva total permanece relativamente constante entre los diferentes *taxa* diversos.

Respecto a la constancia del cambio en la tasa de sustituciones, Avise (1994) señala que, desde un punto de vista empírico, se han constatado diferencias en la evolución de diferentes sitios dentro de una misma molécula y de secuencias homólogas en distintos organismos. En estudios recientes que involucran a peces y a decápodos, Bermingham *et al.* (1997) han encontrado diferencias en las tasas de sustitución. Esto se apoya con otros estudios que también han encontrado diferencias en las tasas de sustitución entre artrópodos y vertebrados, con interpretaciones conflictivas de acuerdo a la posible heterogeneidad de las tasas evolutivas de genes homólogos. Ayala (1986) encontró evidencias del comportamiento errático de los relojes moleculares entre distintos linajes. Algunos investigadores han concluido que la variación entre *taxa* de la tasa molecular media del genoma nuclear es predecible, y por lo general estas variaciones son atribuidas a: diferencias en la duración de las generaciones; replicaciones de ADN en células de la línea germinal; la eficiencia de la reparación durante la replicación de ADN; o, el grado de exposición a mutágenos (Avise, 1994). Con los conocimientos que se tienen en la actualidad es innegable que la mayor parte de los sistemas moleculares evolucionan con tasas heterogéneas en diferentes *taxa*. Por lo tanto, si es que existe un reloj molecular es más bien local que universal. No por ello deja de tener su utilidad ya que la divergencia molecular sigue siendo el mejor indicador de la edad de los ancestros comunes.

Otros argumentos en contra de la utilización de los relojes moleculares se han centrado en la dificultad de calcular los límites de confianza en las estimas de las distancias genéticas (Nei, 1987), debido a lo anteriormente señalado de que la distancia molecular en muchas ocasiones no es lineal respecto al tiempo. Aunque básicamente la calibración de estos relojes moleculares se realiza dividiendo la estima media de la edad del último ancestro común por la medida media de la divergencia molecular y el único error que generalmente se tiene en cuenta es el asociado con la estima de la divergencia molecular. Sin embargo, este error es insignificante en comparación con otras fuentes de error (Hillis *et al.*, 1996).

Los relojes moleculares pueden mejorarse utilizando alguna calibración externa porque el margen de error puede ser muy grande si se recurre a calibraciones procedentes de datos moleculares de secuencias no homólogas, de diferentes moléculas o de diferentes organismos.

Esto es debido a que, como se ha mencionado anteriormente, las tasas de evolución pueden no ser comparables (Avice y Aquadro, 1982). Para ello se utilizan eventos geológicos bien corroborados o el registro fósil (Stepien y Kocher, 1997).

Sin embargo, los fósiles tienden a infravalorar la edad del evento de separación ya que es difícil saber la edad del ancestro común último de un grupo de especies supervivientes y lo más probable es que pertenezcan a momentos de tiempo en las ramas del árbol, anteriores o posteriores al evento de separación. Los datos biogeográficos también presentan alguna dificultad, como la de asumir que el evento de especiación relevante fue causado directamente por el evento geológico correlacionado (Hillis *et al.*, 1996).

En este estudio, a falta de evidencias para realizar una calibración externa del reloj molecular y sabiendo que las calibraciones deberían ser únicamente utilizadas dentro del grupo de organismos para el cual se va a aplicar, se asume una tasa de divergencia muy parecida a la utilizada para los Actinopterygii basada en datos obtenidos por otros autores para este grupo (Bermingham *et al.*, 1997; Bermingham y Orti, 2001; Machordom y Doadrio, 2001). Se puede discutir que esta calibración puede ser insuficiente, pero se trata de especies más o menos próximas en las que se puede presuponer una tasa de evolución similar y esto puede aportar, al menos, indicios acerca del modelo evolutivo y biogeográfico.

Se ha de tener en cuenta que el empleo de los relojes moleculares se encuentra limitado al rango de separación en el que se diferenciaron los *taxa*. La divergencia de los grupos datada por encima de los 50 millones de años puede producir distorsiones en la calibración (Hillis *et al.*, 1996). En este estudio, la mínima separación esperada sería la formación de las cuencas fluviales en las que se encuentran las especies, siendo en todos los casos menores a los 50 millones de años (Rodrigo Álvarez, 1994).

Para aplicar la teoría del reloj molecular tiene que haber una tasa de evolución constante entre las ramas. Las diferencias estadísticas entre las ramas se han calculado mediante el programa PHYLTEST (Kumar, 1996). Este programa realiza el test de tasa relativa, el *two-cluster test* de Takezaki *et al.* (1995), donde la constancia del reloj molecular es examinada para dos linajes siempre en presencia de un tercer linaje. Se diferencia de otros en que éste puede incluir secuencias múltiples en cada linaje. Si L_a y L_b son las medias de los números observados de las sustituciones por sitio (longitud de las ramas) del ancestro común de la clasificación A y B, entonces $L_a = L_b$ es la hipótesis nula bajo la constancia del reloj molecular ($\delta = L_a - L_b = 0$). Como la varianza de δ puede ser estimada, se testa la desviación de δ de 0 mediante un test de dos colas de desviación de la normal (*two-tailed normal deviated test*). Este programa permite la exclusión de poblaciones que muestran las ramas más cortas o largas. El resto de las poblaciones fueron agrupadas mediante el método de máxima verosimilitud, con la finalidad de estimar el tiempo de divergencia aplicando el reloj molecular. Para ello se utilizó el programa PUZZLE (Schmidt *et al.*, 2002) que es una aplicación para reconstruir árboles filogenéticos a partir de datos de secuencias moleculares por máxima verosimilitud. El programa implementa un algoritmo de búsqueda rápida de árbol (*quartet puzzling*) que permite el análisis de grandes conjuntos de datos y permite la asignación automática de estimaciones de

soporte para cada rama interna. La tasa de heterogeneidad (sitios invariables más tasas de distribución *gamma*) es incorporada en todos los modelos de sustitución disponibles (de nucleótidos: TN, HKY, F84, y submodelos; de aminoácidos: Dayhoff, JTT, mtREV24) y puede ser estimada a partir de los datos por máxima verosimilitud. También PUZZLE calcula las distancias de máxima verosimilitud de un par de datos y las longitudes de ramas para árboles especificados por el usuario. Además PUZZLE ofrece un método de mapeo de verosimilitud, para estimar el soporte de las ramas internas sin computar un promedio del árbol.

3.3.6. Biogeografía

El objetivo en esta sección es proponer una reconstrucción de la evolución y la historia biogeográfica de los dos subgéneros de la familia Profundulidae. Sería interesante reconstruir el escenario biogeográfico-histórico del grupo, y las causas o procesos que determinaron los patrones de distribución espacial actuales.

Para ello se ha empleado el método de análisis biogeográfico de dispersión-vicarianza implementado por Ronquist (1996) en su programa DIVA 1.1. Para reconstruir las distribuciones ancestrales a partir de las filogenias se va a utilizar el programa DIVA 1.1. Esta metodología es imprescindible para comprender los patrones actuales de distribución de las especies de la familia Profundulidae e interpretar el mecanismo por el cual ocupan sus rangos de distribución. Además, con esta metodología se pretende conocer cuáles han sido y cuáles son las conexiones entre la biota en el espacio y en el tiempo. Las conexiones en el espacio se determinan a través de los límites de distribución geográfica, mientras que las conexiones en el tiempo se determinan construyendo la filogenia para las especies, y es ahí donde la sistemática molecular juega un papel importante (Mójica, 1998).

La principal forma de especiación dentro de los peces de agua dulce se produce por fenómenos de alopatría, en los que la población ancestral se subdivide, aísla y evoluciona en formas diferenciadas debido a la formación de barreras geográficas. La datación de estas barreras sirve de gran ayuda en la reconstrucción filogenética de las especies. No obstante, no se descartan como posibles otros mecanismos de especiación como la elección de microhábitat (cuando la diferenciación entre especies se produce en un grupo muy relacionado; Brooks y McLennan, 1991), la hibridación y la duplicación cromosómica. Así mismo, los fenómenos de vicarianza no son excluyentes de otros procesos como la dispersión de la ictiofauna a través de capturas fluviales (Banareescu, 1991).

El mecanismo que, básicamente, da lugar a los patrones actuales de distribución que presentan las especies es la combinación de eventos de vicarianza y de dispersión (Rosen, 1978; Brooks y McLennan, 1991) y son los biogeógrafos históricos quienes hipotetizan sobre la importancia relativa de ambos eventos en la evolución de un grupo, para ello emplean la sistemática filogenética (Brooks y McLennan, 1991). La biogeografía histórica completa la biogeografía clásica al comparar las filogenias de grupos monofiléticos que están muy distántemente relacionados como consecuencia de la historia geológica de la región que interesa. Esencialmente el método que utilizado consiste en convertir las filogenias en

cladogramas de área reemplazando los nombres de los *taxa* terminales por el de sus límites geográficos (Platnick y Nelson, 1977). Desviaciones a gran escala de un patrón robusto que corresponda a una historia geológica particular sugiere que la dispersión ha sido el principal mecanismo que ha producido el patrón de distribución observado, aunque también puede indicar que el patrón de distribución observado corresponde a un patrón geológico no actual (Mojica, 1998). Para completar este estudio no se dispone de datos sobre filogenias de otros *taxa* de la zona para realizar este tipo de comparaciones, así que se realizan aproximaciones más simples, pero no por ello menos útiles.

Vargas (1991) realiza un compendio sobre las diferentes escuelas biogeográficas, trata a la biogeografía filogenética como un método preciso que deduce las relaciones filogenéticas a partir de la construcción de cladogramas. Este método se basa en cuatro asunciones principales: a) la especiación alopátrida; b) la homología de los caracteres analizados; c) lo extraño de la evolución paralela de caracteres y/o conjunto de caracteres; y, d) la poca posibilidad de que los organismos con caracteres derivados den lugar a descendientes con caracteres más primitivos.

La biogeografía filogenética se fundamenta en la Regla de Progresión propuesta por Hennig (1966) que asume que los miembros más primitivos de un grupo ocupan el centro de origen o dispersión, y que los miembros más derivados han alcanzado su distribución actual al dispersarse desde el centro. Esta aproximación asume que los organismos apomórficos se dispersan mejor que sus relativos plesiomórficos, una asunción que no se puede sostener. La existencia de un centro de origen, los fenómenos de dispersión y la regla de progresión no son aceptados por las escuelas que asumen el paradigma de la vicarianza como fuente de multiplicación de especies (Humphries y Parenti, 1986) y algunos biogeógrafos ligados a la escuela dispersionista interpretan la regla de progresión en sentido opuesto (Darlington, 1957; Briggs, 1987).

Otra aproximación ha sido propuesta principalmente por Croizat (1958, 1964) y Croizat *et al.* (1974). Este método se denomina actualmente vicarianza o biogeografía cladística. Platnick y Nelson (1978) sostienen que los fenómenos de vicarianza seguidos de especiación alopátrida son los responsables de la distribución actual de los organismos, lo cual implica que especies y áreas evolucionan juntas y, por lo tanto, es posible reconstruir la secuencia de los fenómenos de vicarianza a partir del establecimiento de filogenias. Los fenómenos de dispersión tendrían carácter puntual, serían independientes, posteriores a la emergencia de la barrera y serían los responsables, junto con las extinciones, del enmascaramiento de la identificación de antiguas biotas continuas a partir de disyunciones actuales. Aunque dispersión y vicarianza requieren diferentes tipos de explicación pueden originar modelos similares de distribución (Mayden, 1988). Sin embargo, los partidarios de la biogeografía de vicarianza cladista consideran que la dispersión orientada es rara y muy difícil de comprobar, de modo que sólo recurren a ella cuando, partiendo de una hipótesis de vicarianza, obtienen modelos incongruentes.

El modelo anterior interpreta la distribución del grupo como si evolucionara sólo, en aislamiento de otro(s) organismo(s), y sin relación alguna con la historia ecológica y geográfica de la Tierra. La biogeografía de la vicarianza se ha combinado con las teorías de la filogenia y

sistemática para dar lugar a lo que se denomina biogeografía cladística. A partir de una serie de hipótesis filogenéticas busca la congruencia de las áreas habitadas, para ello sustituye el nombre de la especie en las hipótesis filogenéticas por el área donde esa especie habita. El dendrograma que resulta se denomina cladograma de área. Es decir, transforma cladogramas de *taxa* en cladogramas de áreas, lo cual puede ser analizado usando el método de parsimonia. Cuando se realizan cladogramas para varios grupos de organismos con distribución coincidente, se pueden sugerir hipótesis sobre la historia geográfica del área, que pueden ser independiente de las hipótesis geológicas. Si éstas no son congruentes no significa necesariamente que la filogenia de estos organismos sea incorrecta, sino que los modelos geológicos pueden ser inapropiados.

Esta aproximación recibe varias críticas, como que el origen de las biotas insulares de archipiélagos e islas volcánicas remotas sólo puede ser explicado invocando procesos de dispersión a partir de las biotas continentales correspondientes, en lugar de recurrir a procesos de vicarianza basados en supuestas conexiones antiguas entre las islas del continente. Otra crítica es que la construcción de cladogramas de áreas supone analogías entre áreas y *taxa*, por una parte, y entre *taxa* y caracteres, por otra; tal procedimiento no siempre es correcto dado que las áreas pueden tener múltiples historias, pero los *taxa* sólo una (Cracraft, 1988; Sober, 1988). Además, los análisis de componentes y de parsimonia biogeográfica son métodos reduccionistas, en el sentido que buscan una solución única consensuada en forma de un cladograma general de áreas, cuando en realidad, distintos procesos pueden originar historias complejas entre las áreas de endemismo (hibridación de áreas, fenómenos redundantes de vicarianza que afectan a las mismas áreas en épocas distintas, extinciones, desaparición de barreras, etc). Por ello Cracraft (1988) propone la utilización de métodos no reduccionistas, capaces de generar distintas hipótesis que permitan explicar secuencialmente los modelos históricos derivados de los cladogramas generales de áreas incongruentes. Para finalizar, Wiley (1988) apunta que no es razonable suponer una división apriorística de los *taxa* con amplia distribución en dos entidades independientes, ya que tal tipo de distribución se supone errónea y, por ello, no refleja exactamente una parte de la distribución ancestral inmediata, y esto permite que los *taxa* sean parafileticos o polifileticos.

Hedges (1996) aboga por una aproximación integradora de la biografía histórica que aportaría un mejor conocimiento del que puede aportar la biografía cladística y la vicarianza, estas tendencias consideran que la dispersión no es científica y que debe ser utilizada como último recurso para explicar las distribuciones de los organismos. Sin embargo, la dispersión puede producir los mismos patrones filogenéticos que la vicarianza (Hedges *et al.*, 1994; Sober, 1988). La dispersión también puede producir filogenias totalmente congruentes, incluso con escenarios geológicos, ya diferentes factores (como la proximidad geográfica, corrientes de aire, corrientes de agua, etc) se podrían combinar para producir la dispersión de unas áreas a otras, con una elevada probabilidad. Para discernir entre dispersión y vicarianza es preciso conocer la fecha de divergencia de los *taxa* y sus parientes más cercanos. Así, se podría inferir que los grupos que divergen al mismo tiempo que se producen las separaciones geológicas, surgen por vicarianza, y que los grupos que surgen posteriormente a las separaciones geológicas, lo hacen por dispersión.

Ronquist (1996, 1997) diseñó un nuevo análisis de reconstrucción biogeográfica conocido como *dispersal-vicariance analysis* o DIVA, que permite solucionar muchas de las limitaciones en biogeografía histórica hasta ahora nombradas.

- a) DIVA no restringe las relaciones entre áreas a un patrón jerárquico ni hace ninguna asunción *a priori* sobre la forma o la existencia de un único escenario biogeográfico. Por tanto, permite que las relaciones entre áreas sean reticuladas y múltiples, es decir, puede utilizarse en grupos afectados de distinta forma por los sucesivos eventos geológicos. El resultado del análisis no es un cladograma de áreas sino una reconstrucción de la evolución histórica de las áreas ancestrales del grupo estudiado. Este método asume la existencia de ancestros de amplia distribución, es decir, asume la dispersión en los ancestros.
- b) Por otro lado, en la reconstrucción de distribuciones ancestrales DIVA considera explícitamente los eventos de dispersión y extinción por lo que pertenece al grupo de métodos basados en procesos biogeográficos. Al igual que los otros métodos de reconstrucción biogeográfica, el modelo nulo está basado en la especiación alopátrica por vicarianza geográfica (aunque considera que la dispersión juega un papel importante en la especiación): Esto es así porque, teóricamente, la especiación alopátrica es la más frecuente en la mayoría de organismos (Ronquist, 1997). Además, tanto la dispersión como la extinción son eventos no predecibles y pueden borrar las trazas biogeográficas de vicarianzas o de dispersiones predecibles, entre áreas que han vuelto a unirse. Esto puede introducir elementos espúreos en las reconstrucciones óptimas a menos que estos dos tipos de eventos sean penados, asignándoles un coste. Por tanto, al calcular la distribución óptima se minimizan las extinciones y las dispersiones al azar.
- c) DIVA puede ser empleado por tanto en biogeografía de grupos de historia reciente, grupos más modernos que las áreas que habitan. Pero también puede ser empleado en biogeografía de áreas cuando las reconstrucciones biogeográficas para distintos grupos que habitan el mismo área son comparadas y utilizadas para obtener un patrón general biogeográfico.

Al igual que los otros métodos de biogeografía cladista, DIVA necesita como punto de partida, para la reconstrucción del escenario biogeográfico, una hipótesis filogenética del grupo estudiado. En este trabajo se ha utilizado la filogenia obtenida para la familia Profundulidae mediante el método de máxima parsimonia. Como se obtuvieron varios árboles igualmente parsimoniosos, se utilizó como hipótesis filogenética la del árbol de consenso estricto, que recoge únicamente las cladogénesis corroboradas en todas las hipótesis (árboles) alternativas.

Sin embargo, un inconveniente de DIVA es que la filogenia debe estar completamente resuelta porque el programa no admite politomías en el árbol. Por esta razón, y ya que en los resultados no se obtuvo ninguna filogenia totalmente resuelta, se ha utilizado la filogenia obtenida de aplicar máxima parsimonia con una modificación del método de Wagner a los datos de electroforesis de proteínas, ya que reduce bastante el número de poblaciones, quedando representadas todas las cuencas hidrográficas y todas las especies y grupos de poblaciones estudiadas.

El siguiente paso fue definir las áreas de distribución de los *taxa*. DIVA admite *taxa* de amplia distribución por lo que no existe problema con los grupos cuya distribución ocupa más de un área geográfica (Ronquist, 1996). Como las veinte poblaciones que se han incluido en el análisis pertenecen a distintas cuencas hidrográficas, se han considerado doce áreas de distribución, una por cada cuenca: Guacalate, Bravo, Tehuantepec, Tolimán, Grijalva-Usumacinta, Polochic, Colotepec, Atoyac-Verde, Quetzala, Papagayo, Mixteco-Balsas y Guadalquivir.

Una vez definidas las distribuciones se construyó un fichero NEXUS conteniendo, por un lado, la hipótesis filogenética del grupo en notación parentética y, por otro, las áreas de distribución de cada uno de los taxones que lo forman. Este fichero se analizó con el programa DIVA 1.1 (Ronquist, 1996).

DIVA reconstruye las distribuciones ancestrales de cada uno de los nodos del cladograma de acuerdo con un simple modelo biogeográfico basado en la vicarianza: si el patrón observado se ajusta bien al escenario biogeográfico clásico, este será la reconstrucción óptima. Considera cuatro tipos de eventos biogeográficos a los que asigna costes distintos:

- a) vicarianza: especiación alopátrica por vicarianza, en la que el área ancestral se divide en dos conjuntos de áreas mutuamente excluyentes. El coste de este evento es 0 porque el modelo nulo del análisis es la especiación alopátrica por vicarianza;
- b) especiación simpátrica: Una especie se divide dentro del área para dar lugar a dos descendientes, que permanecen en la misma área. Ronquist (1996) señala que este evento equivale a una especiación alopátrica dentro del área unida o dispersión predecible a pequeña escala (barrera temporal). Por tanto, el coste de este evento es de nuevo;
- c) dispersión: Se refiere a la dispersión al azar, aquella que se produce a través de barreras preexistentes. Equivale a la adición de una o más áreas a la distribución de un taxon. El coste es 1 por cada área añadida;
- d) extinción: Es la unión de una o más áreas a la distribución original. El coste es de 1 por cada área eliminada. Todas las especies deben darse en al menos un área.

DIVA encuentra la/s reconstrucción biogeográfica/s óptima utilizando la parsimonia como criterio de optimización: la reconstrucción óptima será la menos costosa, aquella que permite minimizar el número de dispersiones y extinciones.

El programa construye una matriz de optimización que especifica el coste de los eventos que permiten pasar de una distribución ancestral a la descendiente; en este caso, sin embargo, la matriz es tridimensional porque cada ancestro presenta dos descendientes. El algoritmo de optimización permite calcular el coste de todas las posibles distribuciones ancestrales en

función de las distribuciones de los descendientes, moviéndose primero desde los terminales hacia la raíz (*downward pass*) y luego en sentido contrario (*upward pass*) hasta obtener las distribuciones ancestrales que impliquen el menor número de dispersiones o extinciones (Ronquist, 1996).

Sin embargo, puesto que esta metodología implicaba un número excesivo de cálculos, Ronquist (1996) introdujo dos nuevas reglas que deben tenerse en cuenta en el cálculo de la distribución óptima:

- a) la distribución óptima del nodo ancestral no puede contener un área que no esté presente en alguno de los descendientes. Se admite que el ancestro se dispersara pero no que se haya dispersado a un área distinta y extinguido en esa misma área antes del evento de especiación;
- b) la distribución óptima del nodo ancestral debe contener al menos una de las áreas de los descendientes. Esto equivale a que, aunque los descendientes se dispersen, tienen que estar al menos en una de las áreas ancestrales.

DIVA presenta dos tipos de búsqueda distinta: una búsqueda exacta, la aplicada en este estudio, que proporciona todas las distribuciones ancestrales óptimas en cada nodo, y una búsqueda heurística, que reduce el número de distribuciones que se retienen en cada nodo en el cálculo. Esta última búsqueda se emplea cuando muchos de los terminales son de amplia distribución, lo que no sucede en este estudio.

A veces se pueden obtener en un mismo nodo reconstrucciones alternativas con el mismo coste evolutivo pero que implican combinaciones de eventos geográficos distintos, por ejemplo vicarianza seguida de dispersión o especiación simpátrica seguida de extinción. Estas reconstrucciones implican procesos alternativos, *a priori* igualmente probables. Para poder elegir entre estas posibles reconstrucciones se puede recurrir a los datos geológicos sobre el área o a dataciones de algunos de los eventos cladogenéticos de la filogenia del grupo.

Por otro lado, se ha utilizado el test no paramétrico de Mantel (1967) para estudiar la correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas. El test de Mantel, que sirve para correlacionar dos matrices de distancias, ayuda a interpretar las interacciones espacio-tiempo, en este caso expresadas como interacciones entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). Para una distribución contagiosa, donde influyan los efectos de vecindad, se espera que exista una correlación entre las distancias geográficas cortas y las distancias genéticas. La hipótesis nula que este test contrasta es la independencia de las distancias geográficas y de las distancias genéticas. El test estadístico aplicado es la suma de los productos de las distancias geográficas y genéticas entre todos los los pares de casos posibles.

Su fórmula es:

$$Z = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N s_{ij} t_{ij}$$

donde N es el número de casos, t_{ij} es la distancia entre los casos i y j en el tiempo y s_{ij} es la distancia entre los casos en el espacio. Cuando se presenta interacción espacio-tiempo, los casos próximos en el espacio están próximos en el tiempo.



4. Resultados

4.1. Descripción de zimogramas

Un primer paso en este estudio es realizar una detallada descripción de los zimogramas para obtener los patrones electroforéticos para los 14 sistemas enzimáticos analizados (Anexos 1 y 2). Así, en la siguiente descripción se denomina frecuencia “más alta” a la frecuencia 1, “muy elevada” a las frecuencias comprendidas entre 1 y 0,9, “elevada” a las frecuencias comprendidas entre 0,9 y 0,7 inclusive, “media” a las comprendidas entre 0,7 y 0,3, “baja” a las comprendidas entre 0,3 y 0,1 inclusive, “muy bajas” a las comprendidas entre 0,1 y 0 y, “mínima” a la frecuencia 0.

4.1.1. AAT (Aspartato-aminotransferasa. N°.C.E. 2.6.1.1)

Enzima con estructura de tipo dimérico. Tiene otros nombres alternativos como transaminasa A, glutámico-oxalacético transaminasa, y glutámico-aspartico transaminasa.

AAT cataliza la transferencia reversible del grupo amino del L-aspartato al 2-oxoglutarato para formar oxalacetato y glutamato. En el músculo se detectan dos loci de migración anódica (*AAT-1* y *AAT-2*) y uno de migración catódica (*AAT-3*), y en el hígado se detecta una forma de migración anódica (que corresponde con *AAT-2*) y otra de migración catódica (*AAT-3*, el mismo que se expresa en músculo). Por analogía con otros estudios (Buth, 1983; Machordom, 1992) se pueden hacer corresponder los loci de migración anódica con las formas s-AAT localizadas en el citosol y el loci de migración catódica con la forma m-AAT, encontrada en las mitocondrias).

El alelo *AAT-1-100**, que no es muy común, y aparece en los dos subgéneros. Se presenta con una frecuencia alta en Atoyac1, con una frecuencia media en Colotepec2 y Chiapas (*terra typica* de *P. hildebrandi*), con una frecuencia baja en Colotepec1, Manialtepec y Virgen (*terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*), y con una frecuencia muy baja en la población de Tolimán.

El alelo *AAT-1-70**, se presenta únicamente en el subgénero *Profundulus* y es exclusivo de Mixteco2, donde aparece con frecuencia muy baja.

El alelo *AAT-1-80** también aparece solamente en el subgénero *Profundulus* y es un alelo exclusivo de Atoyac8, y tiene una frecuencia baja.

El alelo *AAT-1-87** sólo se da en el subgénero *Profundulus*. Aparece con la frecuencia más alta en Atoyac2, Atoyac3 y Mixteco1, y en Papagayo1 (*terra typica* de *P. balsanus*), y con frecuencia elevada en Pichuacán.

El alelo *AAT-1-90** se presenta en los dos subgéneros. Con frecuencia baja en Manialtepec, donde es exclusivo dentro del subgénero *Profundulus* y con frecuencia media en Virgen, donde es exclusivo dentro del subgénero Tlaloc.

El alelo *AAT-1-93** se presenta en el subgénero *Profundulus* y es exclusivo de Tehuantepec2, donde aparece con frecuencia media.

El alelo *AAT-1-95** es el más común de todos. Aparece con la frecuencia más alta o elevada en todas las poblaciones del subgénero *Profundulus* excepto en Atoyac2, Atoyac3, Mixtecol y Papagayo1, donde no aparece. En Tehuantepec2, Colotepec2 y Manialtepec se da con frecuencia media y en Pichuacan se da en una frecuencia baja. Dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo raro en Chiapas, donde se da con frecuencia muy baja.

El alelo *AAT-1-105** sólo se expresa en las poblaciones del subgénero *Tlaloc*. se presenta con la frecuencia más alta en las poblaciones de Jerónimo (*terra typica* de *P. labialis*), Selegua, Comalatengo, Grande y Nentón (*terra typica* de *P. candalarius*), y con frecuencia baja en Virgen.

El alelo *AAT-1-110**, sólo se presenta en el subgénero *Tlaloc* y es exclusivo de Chiapas y de Virgen, donde aparece con frecuencia baja y muy baja respectivamente.

El alelo *AAT-2-50** es el más común de todos los de este locus. Se presenta tanto en poblaciones del subgénero *Tlaloc* como en poblaciones del subgénero *Profundulus*. Se expresa con la frecuencia más alta en todas las poblaciones excepto en Papagayo1 y Papagayo2 donde se da con frecuencia elevada; en Quetzala, Mixtecol y Atoyac3 se da con frecuencia media; en Atoyac2 con frecuencia baja y en Colotepec1 y Atoyac1 con frecuencia muy baja. En Tehuantepec2, Coyul, Colotepec2, Manialtepec, Pichuacan, Comalatengo, Chiapas y Virgen no se expresa.

El alelo *AAT-2-60** se presenta únicamente en el subgénero *Profundulus* y es un alelo fijado en Tehuantepec2.

El alelo *AAT-2-80** sólo se da en el subgénero *Profundulus*. Aparece con la frecuencia más alta en Pichuacan y con frecuencia elevada en las poblaciones de Atoyac2, Coyul y Colotepec2. En Colotepec1, Manialtepec, Quetzala, Mixtecol y Atoyac3 con frecuencia media y, en Papagayo1 y Papagayo2 con frecuencia baja.

El alelo *AAT-2-90** presente solamente en el subgénero *Profundulus* es poco común y aparece en Colotepec1 y Manialtepec con frecuencia media, en Colotepec2 y Coyul con frecuencia baja y, en Atoyac1 y Quetzala con frecuencia muy baja.

El alelo *AAT-2-97** presente sólo en el subgénero *Tlaloc* se expresa con la frecuencia más alta en las poblaciones de Chiapas, Virgen y Comalatengo.

El alelo *AAT-3-100** únicamente se expresa en el subgénero *Tlaloc*. Aparece con frecuencia muy baja en Jerónimo y Comalatengo.

El alelo *AAT-3-103** se expresa en todas las poblaciones del subgénero *Tlaloc*, con la frecuencia más alta en Selegua, Grande, Nentón, Chiapas y Virgen y con frecuencia muy elevada en Jerónimo y Comalatengo.

El alelo *AAT-3-105**, que se expresa solamente en las poblaciones del subgénero *Profundulus*, aparece con la frecuencia más alta en Colotepec2, Pichuacan, Quetzala, Papagayo1 y Papagayo2. Con una frecuencia muy elevada en Colotepec1, con una frecuencia baja en Novillero y Atoyac8 y con una frecuencia muy baja en Chacalapa, Coyul y Atoyac1.

El alelo *AAT-3-110** es el más común de este locus. Aparece en todas las poblaciones del subgénero *Profundulus* excepto en Colotepec2, Pichuacan, Quetzala, Papagayo1, Papagayo2 y Mixtecol.

Resultados

El alelo *AAT-3-120** se presenta únicamente en dos poblaciones del subgénero *Profundulus*, en Mixtec01 con la frecuencia más alta y en Atoyac2 con una frecuencia elevada.

Genotipo en <i>AAT-1*</i>	Genotipo en <i>AAT-2*</i>	Genotipo en <i>AAT-3*</i>	Poblaciones
105/105	97/97	103/103	Com
105/105	97/97	100/103	Com
105/105	50/50	103/103	Jer, Gra, Sel, Nen
105/105	50/50	100/103	Jer
100/110	97/97	103/103	Chi
100/110	---	103/103	Vir
100/100	97/97	103/103	Chi, Vir
100/100	90/90	105/105	Col1
100/100	80/80	110/110	Ato1
100/100	80/80	105/105	Col2
100/100	80/90	110/110	Ato1
100/100	80/90	105/105	Col2
100/100	50/90	105/105	Col1
95/95	90/90	105/105	Col1
95/95	80/80	110/110	Coy
95/95	80/80	105/105	Que, Pic, Col1, Col2, Coy
95/95	60/60	110/110	Teh2
95/95	50/50	110/110	Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix2, Cha, Teh1, Nov, Tol, Chi, Pol
95/95	50/50	105/105	Que, Cha, Nov, Pap2, Gua, Bra
95/95	80/90	110/110	Man, Col1, Coy
95/95	80/90	105/105	Col1, Col2
95/95	50/90	105/105	Que
95/95	50/80	105/105	Que, Pap2
95/100	90/90	105/105	Col1
95/100	80/80	110/110	Ato1
95/100	80/80	105/105	Ato1, Col1
95/100	80/90	110/110	Man, Col1
95/100	80/90	105/105	Col1, Col2

Genotipo en <i>AAT-1</i> *	Genotipo en <i>AAT-2</i> *	Genotipo en <i>AAT-3</i> *	Poblaciones
95/100	---	103/103	Chi
95/100	50/50	110/110	Tol
93/93	60/60	110/110	Teh2
90/105	97/97	103/103	Vir
90/90	97/97	103/103	Vir
90/95	80/90	110/110	Man
87/87	80/80	120/120	Ato2, Mix1
87/87	80/80	110/110	Ato3
87/87	80/80	105/105	Pap1
87/87	50/50	120/120	Mix1
87/87	50/50	110/110	Ato2, Ato3
87/87	50/50	105/105	Pap1
87/87	50/80	105/105	Pap1
87/95	80/80	105/105	Pic
80/95	50/50	105/105	Ato8
70/95	50/50	110/110	Mix2
---	50/50	110/110	Gri
---	50/50	105/105	Ato1

4.1.2. AK (Adenilato-quinasa. N°.C.E. 2.7.4.3)

Esta enzima tiene como nombre alternativo mioquinasa, es una enzima monomérica pequeña que cataliza la transferencia reversible de MgATP a AMP ($\text{MgATP} + \text{AMP} = \text{MgADP} + \text{ADP}$). Se expresa en el músculo de los individuos de todas las poblaciones.

El alelo *AK-100**, presente en las poblaciones de los dos subgéneros es el más común, y está presente con la más alta frecuencia en todas las poblaciones excepto en Atoyac8 donde se expresa con una frecuencia muy elevada, en Papagayo1 donde se expresa con una frecuencia elevada y en Atoyac4, donde se expresa con una frecuencia baja.

El resto de los alelos de este locus se expresan únicamente en el subgénero *Profundulus*.

El alelo *AK-102** es exclusivo de la población Papagayo1, y aparece con una frecuencia baja.

El alelo *AK-105** aparece con una frecuencia baja en Papagayo1 y muy baja en Atoyac8.

El alelo *AK-110** es exclusivo de la población Atoyac4, donde aparece con una frecuencia elevada.

Resultados

Genotipo en <i>AK</i> *	Poblaciones
110/110	Ato4
105/105	Pap1
102/102	Pap1
100/100	Ato1, Ato2 Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix1, Mix2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Jer, Gra, Chi, Com, Sel, Vir, Nen, Pol
100/105	Ato8

4.1.3. CK (Creatina-quinasa. N°.C.E. 2.7.3.2)

CK tiene una función importante en el metabolismo energético de los vertebrados (Bessman y Carpenter, 1985). Cataliza la transferencia reversible de fosfato del ATP a la creatina, dando como resultado fosfocreatina y ADP. Hay diferentes formas de esta enzima, todas ellas muy relacionadas. La que en este caso interesa se encuentra en el músculo (Wyss et al., 1992) y es citosólica. Esta enzima se expresa en el músculo de los individuos de todas las poblaciones analizadas, y posee una estructura de tipo monomérico, cuyo patrón obtenido es bastante sencillo.

El alelo *CK-97** es marcador de Selegua, Jerónimo y Comalatengo, y el alelo *CK-105** es exclusivo de Nentón y Grande, expresándose con la frecuencia más alta en Grande y con frecuencia elevada en Nentón. Estos dos alelos sólo se expresan en poblaciones del subgénero *Tlalo*.

El alelo *CK-100** es el más común de todos y el *CK-95** aparece únicamente en algunas poblaciones del subgénero *Profundulus*.

Genotipo en <i>CK</i> *	Poblaciones
105/105	Nen, Gra
100/100	Ato1, Ato2, Ato3, Mix1, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Chi, Vir, Pol
100/105	Nen
97/97	Jer, Com, Sel

Genotipo en <i>CK</i> *	Poblaciones
95/95	Ato5, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix2, Pic, Gri, Pap1
95/100	Ato7, Ato8

4.1.4. EST (Carboxilesterasa. N°.C.E. 3.1.1.1)

Conocida también como ali-esterasa, B-esterasa, monobutirasa, cocaína esterasa, procaína esterasa y metilbutirasa. Los eucariotas superiores tienen distintas esterases. Entre los diferentes tipos se encuentran las que ahora interesan, las carboxilesterasas. Éstas se clasifican en distintas categorías en base a los diferentes patrones de inhibición de los organofosfatos.

Esta enzima tiene una estructura monomérica y se expresa en el músculo de los individuos estudiados. Dos son los loci que aparecen en los zimogramas, *EST-1* y *EST-2*.

El alelo *EST-1-100** es el más común dentro de los de este locus. Se da en todas las poblaciones del subgénero *Profundulus*, excepto en las de Atoyac2, Atoyac3, Mixtecol, Grijalva y Tehuantepec2. Aparece con la más alta frecuencia en todas las poblaciones salvo en Polochic y Atoyac1, donde se expresa con una frecuencia muy elevada; en Quetzala y en Novillero aparece con una frecuencia media y en Chacalapa, se expresa con frecuencia muy baja. Dentro del subgénero *Tlaloc*, es exclusivo en Nentón, y con frecuencia baja.

El alelo *EST-1-80** se expresa solamente en el subgénero *Profundulus* y es un alelo raro de Tehuantepec2 que se expresa con una frecuencia muy baja.

El alelo *EST-1-90** se expresa en los dos subgéneros y dentro del subgénero *Profundulus* se presenta con alta frecuencia más alta en Atoyac2, Atoyac3, Mixtecol, y en Grijalva. Se da con frecuencia media en Tehuantepec2 y baja en Chacalapa, y dentro del subgénero *Tlaloc* es exclusivo de Nentón, donde aparece con muy baja frecuencia.

El alelo *EST-1-95** sólo se da en el subgénero *Profundulus* y se expresa con frecuencia media en Chacalapa, Novillero y Tehuantepec2, y con frecuencia muy baja en Atoyac1.

El alelo *EST-1-98**, presente tan sólo en el subgénero *Profundulus*, es un alelo raro de Atoyac1, expresándose por lo tanto con frecuencia muy baja.

El alelo *EST-1-105** se presenta con la más alta frecuencia en todas las poblaciones del subgénero *Tlaloc*, excepto en Nentón donde se expresa con frecuencia elevada. Dentro del subgénero *Profundulus* es un alelo exclusivo de Polochic, y se expresa con una frecuencia muy baja.

El alelo *EST-1-110** se expresa en el subgénero *Profundulus*, es un alelo exclusivo de Quetzala, donde aparece con frecuencia media.

El alelo *EST-2-100** es el más común entre los alelos de este locus y se expresa en los dos subgéneros. Se da con la frecuencia más alta en todas las poblaciones del subgénero *Profundulus*, salvo: en Atoyac1 y Atoyac7 donde se expresa con frecuencia elevada; en

Resultados

Quetzala se expresa con una frecuencia elevada; en Atoyac2 y Atoyac3, donde la frecuencia es media; en Mixteco2 tiene una frecuencia baja. Dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo fijado que comparten Chiapas y Virgen.

El alelo *EST-2-80**, que se expresa tan sólo en el subgénero *Profundulus*, es un alelo raro en Atoyac1.

El alelo *EST-2-90** se presenta en los dos subgéneros. Dentro del subgénero *Profundulus* se da con frecuencia elevada en Mixteco2, con una frecuencia media en Atoyac2 y Atoyac3, y con frecuencia muy baja en Atoyac1, Atoyac7 y Quetzala. Dentro del subgénero *Tlaloc* es exclusivo en Jerónimo, con una frecuencia baja.

El alelo *EST-2-95** se presenta únicamente en el subgénero *Tlaloc*. Es exclusivo de Jerónimo, Selegua, Comalatengo, Virgen y Chiapas, con frecuencia más alta en todas las poblaciones excepto en Jerónimo donde es elevada.

El alelo *EST-2-110** tan sólo se da en el subgénero *Profundulus* y es exclusivo de Quetzala, donde aparece con frecuencia baja.

Genotipos en <i>EST-1*</i>	Genotipos en <i>EST-2*</i>	Poblaciones
110/110	110/110	Que
110/110	100/100	Que
110/110	90/90	Que
105/105	100/100	Chi, Vir, Pol
105/105	95/95	Jer, Gra, Com, Sel, Nen
105/105	90/90	Jer
105/105	90/95	Jer
100/100	100/100	Ato1, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Nov, Tol, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Pol
100/100	95/95	Nen
100/100	90/90	Mix2
100/100	100/110	Que
100/100	90/100	Ato7
100/100	80/100	Ato1
100/105	95/95	Nen
98/98	100/100	Ato1

Genotipos en <i>EST-1*</i>	Genotipos en <i>EST-2*</i>	Poblaciones
95/95	100/100	Cha, Teh2, Nov
95/100	90/100	Ato1
90/90	100/100	Ato2, Ato3, Mix1, Cha, Teh2, Gri,
90/90	90/90	Ato2, Ato3
90/90	90/100	Ato2, Ato3
90/105	95/95	Nen
90/95	100/100	Cha, Teh2
80/90	100/100	Teh2

4.1.5. FUM (Fumarato hidratasa. N°.C.E. 4.2.1.2)

Esta enzima se conoce también como fumarato hidratasa. Cataliza la hidratación reversible que produce el paso del fumarato al L-málico. Existen dos clases de fumarasas, la clase I formada por enzimas con estructura dimérica y la clase 2, que es la que en este estudio interesa, formada por enzimas termoestables, tetraméricas y que se encuentran en procariotas y en eucariotas. Únicamente se ha detectado un locus en el músculo de todas las especies estudiadas.

El alelo *FUM-100** se expresa en los dos subgéneros. Es el más común entre todas las poblaciones del subgénero *Profundulus*, no se expresa únicamente en Tehuantepec2 y en Atoyac2. Dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo raro de Chiapas.

El alelo *FUM-90** se da en el subgénero *Profundulus*. No es muy común pero aparece con la más alta frecuencia en Tehuantepec2, Pichuacan y Atoyac2. Con frecuencia elevada en Grijalva, Quetzala, Atoyac1 y Atoyac3, con frecuencia media en Atoyac5, Atoyac6, Tolimán, Colotepec2 y Mixteco1. Con frecuencia baja en Atoyac7 y muy baja en Chacalapa.

El alelo *FUM-95**, también presente tan sólo en el subgénero *Profundulus*, se da exclusivamente en Atoyac1 y Chacalapa con una frecuencia muy baja.

El alelo *FUM-107** se da en los dos subgéneros. Dentro del subgénero *Profundulus* aparece con frecuencia muy baja en Chacalapa y Colotepec2 y dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo raro de Comalatengo.

El alelo *FUM-115** aparece con la más alta frecuencia en Jerónimo, Selegua, Grande y Virgen, con frecuencia muy elevada en Chiapas y Comalatengo y con frecuencia elevada en Nentón. Es exclusivo del subgénero *Tlaloc*.

El alelo *FUM-130** también se expresa únicamente en el subgénero *Tlaloc* y es exclusivo de la población de Nentón, donde se expresa con frecuencia baja.

Genotipo en <i>FUM*</i>	Poblaciones
130/130	Nen

Genotipo en <i>FUM</i> *	Poblaciones
115/115	Jer, Gra, Chi, Com, Sel, Vir, Nen
115/130	Nen
107/115	Com
100/100	Ato1, Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix1, Mix2, Que, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Chi, Pol
100/107	Col2, Cha
95/100	Ato1, Cha
90/90	Ato1, Ato2, Ato3, Ato5, Ato6, Ato7, Mix1, Que, Pic, Col2, Cha, Teh2, Tol, Gri

4.1.6. IDH (Isocitrato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente. N°.C.E. 1.1.1.42)

Esta enzima tiene como nombre alternativo oxalosuccinato decarboxilasa. Es una enzima importante del metabolismo de los carbohidratos y cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a alfa-cetoglutarato, y es dependiente de NADP (González-Villaseñor y Powers, 1985). La estructura cuaternaria de esta enzima es de tipo dímérico. Se expresa un locus en músculo (*IDH-1*) y otro en hígado (*IDH-2*).

El alelo *IDH-1-89** es exclusivo de Atoyac8, perteneciente al subgénero *Profundulus*, donde aparece con una frecuencia baja.

El alelo *IDH-1-90** es exclusivo del subgénero *Profundulus*, allí se expresa con la más alta frecuencia en todas las poblaciones excepto en Atoyac8 donde se expresa con frecuencia elevada.

El alelo *IDH-1-95** es marcador del subgénero *Tlaloc*.

El alelo *IDH-2-100** es el más común de este locus y aparece en los dos subgéneros. Se expresa con la más alta frecuencia en Guacalate (*terra typica* de *P. guatemalensis*), Tehuantepec2, Colotepec1, Colotepec2, Atoyac1, Atoyac2, Atoyac3, Maniatepec, Pichuacan, Papagayo1, Mixteco1 y Virgen. Con frecuencia muy elevada en Tolimán, Quetzala y Papagayo2. Con frecuencia elevada en Coyul. Con frecuencia media en Bravo (*terra typica* de *P. scapularis*), Tehuantepec1 y Atoyac8. Con frecuencia baja en Novillero, Atoyac7, Comalatengo y Chiapas.

El alelo *IDH-2-70** se da con la más alta frecuencia en Mixteco2, y con frecuencia elevada en Atoyac6 y Atoyac7. Con frecuencia media en Atoyac5 y con frecuencia baja en Atoy4 y en Atoyac8. Se podría decir que es un alelo exclusivo de estas poblaciones.

El alelo *IDH-2-75** aparece con la frecuencia más alta y con una frecuencia muy baja en Tolimán y Papagayo2.

El alelo *IDH-2-80** se expresa con la más alta frecuencia en Chacalapa, con frecuencia elevada en Novillero y Atoyac4. Con frecuencia media en Atoyac5 y Atoyac8. Con frecuencia baja en Tehuantepec1, Coyul y Atoyac6 y con una frecuencia muy baja Bravo, Quetzala y Atoyac7. Los tres últimos alelos se expresan tan sólo en el subgénero *Profundulus*.

El alelo *IDH-2-90** se da en los dos subgéneros y aparece con frecuencia baja en Bravo y Coyul. Es exclusivo de Chiapas donde se expresa con frecuencia elevada.

El alelo *IDH-2-105** también se expresa en los dos subgéneros. Lo hace con la frecuencia más alta en Polochic, con frecuencia media en Comalatengo y Grande, con frecuencia baja en Bravo y Nentón y con frecuencia muy baja Jerónimo y Chiapas. Todas son poblaciones de la vertiente atlántica excepto Bravo.

El alelo *IDH-2-108**, que se expresa tan sólo en el subgénero *Tlaloc*, es un alelo fijado en la población de Selegua.

El alelo *IDH-2-110** se expresa únicamente en el subgénero *Profundulus* y es un alelo exclusivo de Tehuantepec1, donde se expresa con frecuencia baja.

El alelo *IDH-2-118** se expresa en poblaciones del subgénero *Tlaloc*. Con frecuencia elevada en Jerónimo y Nentón, y con frecuencia media en Comalatengo y Grande.

El alelo *IDH-2-120** es un alelo raro de la población de Jerónimo, del subgénero *Tlaloc*.

El alelo *IDH-2-0** es un alelo raro de Atoyac5, población del subgénero *Profundulus*.

Genotipo en <i>IDH-1*</i>	Genotipo en <i>IDH-2*</i>	Poblaciones
95/95	118/118	Jer, Gra, Com, Nen
95/95	108/108	Sel
95/95	105/105	Jer, Com
95/95	100/100	Chi, Com, Sel
95/95	90/90	Chi
95/95	118/120	Jer
95/95	105/118	Jer, Gra, Com, Nen
95/95	100/105	Chi
95/95	90/100	Chi
90/90	110/110	Teh1
90/90	105/105	Bra, Pol
90/90	100/100	Ato1, Ato2, Ato3, Ato8, Mix1, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Pap1, Pap2, Gua, Bra

Resultados

Genotipo en <i>IDH-1</i> *	Genotipo en <i>IDH-2</i> *	Poblaciones
90/90	80/80	Ato4, Ato5, Ato8, Cha, Nov
90/90	75/75	Gri
90/90	70/70	Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Mix2
90/90	100/105	Bra
90/90	90/105	Bra
90/90	90/100	Coy, Bra
90/90	80/105	Bra
90/90	80/100	Ato7, Ato8, Que, Coy, Teh1, Nov, Bra
90/90	75/100	Tol, Pap2
90/90	70/100	Ato7, Ato8
90/90	70/80	Ato5, Ato6, Ato8
90/90	0/80	Ato5
89/89	80/100	Ato8

4.1.7. LDH (L-Lactato deshidrogenasa. N°.C.E. 1.1.1.27)

También conocida como ácido láctico deshidrogenasa. Cataliza la conversión reversible entre el piruvato y el L-lactato; esta reacción es dependiente de NAD⁺. En el músculo de vertebrados y en las bacterias del ácido láctico representa el paso final en la glicolisis anaeróbica.

Enzima de estructura cuaternaria tetramérica. Se expresan dos loci en el músculo de los individuos estudiados.

El alelo *LDH-1-100** se expresa en el subgénero *Profundulus*. Con frecuencia baja en Colotepec1, Papagayo2 y Atoyac3 y con frecuencia muy baja en Papagayo1 y Colotepec2.

El alelo *LDH-1-5**, que se da exclusivamente en el subgénero *Tlaloc*, es un alelo raro de Nentón.

El alelo *LDH-1-10** es un alelo marcador de Guacalate y Polochic y exclusivo del subgénero *Tlaloc* donde se expresa con la más alta frecuencia en Jerónimo, Selegua, Comalatengo y Virgen, con frecuencia muy elevada en Grande y Nentón y con frecuencia elevada en Chiapas.

El alelo *LDH-1-50**, que aparece en los dos subgéneros, se expresa con la más alta frecuencia en Atoyac4, Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8 y Mixteco2. Se presenta con frecuencia baja en Chiapas y muy baja en Grande.

El alelo *LDH-1-95** es el más común de todos los alelos de este locus y no se expresa en las poblaciones del subgénero *Tlaloc*.

El alelo *LDH-1-112** se expresa únicamente en el subgénero *Profundulus* y es un alelo exclusivo de Tehuantepec1, donde está presente con frecuencia baja.

El alelo *LDH-2-100** es el alelo más común de todas las poblaciones estudiadas entre todos los de este locus, y sólo aparece en las poblaciones del subgénero *Profundulus*. Se presenta con la frecuencia más alta en todas las poblaciones, excepto en Atoyac8 donde se da con frecuencia muy elevada; en Bravo, Atoyac2, Atoyac4 y Atoyac6 se presenta con elevada; en Papagayo1 se expresa con una frecuencia media, y no se expresa en Guacalate y Atoyac7.

El alelo *LDH-2-70** es un alelo exclusivo de Atoyac7 donde se expresa con frecuencia elevada.

El alelo *LDH-2-80** se expresa con frecuencia muy baja en Papagayo1 y Atoyac7.

El alelo *LDH-2-90** sólo se da en poblaciones se expresa con frecuencia baja en Atoyac6 y en Atoyac7.

El alelo *LDH-2-101** se expresa con frecuencia muy baja en Atoyac2, Atoyac4 y Atoyac6.

El alelo *LDH-2-102** se expresa con frecuencia media en Papagayo1, es un alelo exclusivo. Los cinco últimos alelos, escasamente representados, sólo se expresan en el subgénero *Profundulus*.

El alelo *LDH-2-105** se da en poblaciones de los dos subgéneros. Se presenta con frecuencia baja en Bravo y muy baja Atoyac8. Es un alelo exclusivo de Nentón, donde se expresa con frecuencia baja.

El alelo *LDH-2-130** es exclusivo del subgénero *Tlaloc* y aparece en todas las poblaciones de este subgénero con la más alta frecuencia, excepto en Nentón, donde se da con una frecuencia elevada. Es un alelo fijado en Guacalate.

Genotipo en <i>LDH-1*</i>	Genotipo en <i>LDH-2*</i>	Poblaciones
112/112	---	Teh1
100/100	100/100	Ato3, Col2, Pap2
100/100	80/102	Pap1
---	100/100	Col1
95/95	102/102	Pap1
95/95	100/100	Ato1, Ato2, Ato3, Mix1, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Bra
95/95	100/105	Bra
95/95	100/101	Ato2

Resultados

Genotipo en <i>LDH-1</i> *	Genotipo en <i>LDH-2</i> *	Poblaciones
50/50	130/130	Chi
50/50	101/101	Ato6
50/50	100/100	Ato4, Ato5, Ato6, Ato8, Mix2
50/50	100/105	Ato8
50/50	90/90	Ato7
50/50	70/70	Ato7
50/50	70/80	Ato7
10/10	130/130	Gua, Jer, Chi, Com, Sel, Nen, Gra
10/10	105/105	Nen
10/10	100/100	Pol
10/10	105/130	Nen
10/50	130/130	Gra
5/5	---	Nen
---	130/130	Vir
---	101/101	Ato4
---	90/90	Ato6

4.1.8. MDH (Malato deshidrogenasa. N°.C.E. 1.1.1.37)

También conocida como málico deshidrogenasa. Cataliza la interconversión de malato a oxalacetato utilizando como cofactor el sistema NAD/NADH. La enzima participa en el ciclo del ácido cítrico y existe en todos los organismos aeróbicos.

Enzima con estructura de tipo dimérico. Se detecta un locus en músculo (*MDH-1*) y otro en hígado (*MDH-2*).

El alelo *MDH-1-100** es exclusivo del subgénero *Tlaloc*, se expresa con la más alta frecuencia en Grande, Chiapas y Virgen, con una frecuencia muy elevada en Comalatengo y Nentón y, con una frecuencia elevada en Jerónimo y Selegua. Es un alelo raro de Atoyac1.

El alelo *MDH-1-70** es el más común de entre todos los de este locus. Está presente, con la más alta frecuencia en todas las poblaciones del subgénero *Profundulus*, excepto en Bravo y Atoyac8 donde se presenta con una frecuencia muy elevada, en Atoyac1 donde se presenta con frecuencia elevada y en Polochic, donde es ausente.

El alelo *MDH-1-80** se expresa en los dos subgéneros. Está presente con la más alta frecuencia en Polochic, con una frecuencia baja en Atoyac1, Jerónimo y Selegua y con una frecuencia muy baja en Bravo, Atoyac8, Comalatengo y Nentón.

El alelo *MDH-2-130** se da en poblaciones de los dos subgéneros y es el alelo más común de este locus, estando presente en todas las poblaciones con la más alta frecuencia, excepto en Atoyac8, Selegua y Grande donde se expresa con una frecuencia muy elevada y en Jerónimo, donde se expresa con frecuencia elevada.

El alelo *MDH-2-100** es un alelo exclusivo de la población de Selegua, donde se presenta con una frecuencia muy baja.

El alelo *MDH-2-132** es un alelo raro de la población Grande. Estos dos últimos alelos se expresan tan sólo en el subgénero *Tlaloc*.

El alelo *MDH-2-140** está escasamente representado en los dos subgéneros. Es un alelo raro de Atoyac8 y exclusivo de Jerónimo, donde se expresa con una frecuencia muy baja.

Genotipo en <i>MDH-1*</i>	Genotipo en <i>MDH-2*</i>	Poblaciones
100/100	140/140	Jer
100/100	130/130	Ato1, Jer, Gra, Chi, Com, Sel, Vir, Nen
100/100	130/132	Gra
100/100	100/130	Sel
100/100	---	Coy
80/80	130/130	Jer, Pol
80/100	130/130	Jer, Com, Sel, Nen
70/70	130/130	Ato1, Ato2, Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix1, Mix2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra
70/80	130/140	Ato8
70/80	130/130	Ato1, Bra

4.1.9. ME (Malato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente. N°.C.E. 1.1.1.40)

Las enzimas málicas, o malato-oxidoreductasas, catalizan la descarboxilación oxidativa del malato en piruvato, paso importante para un amplio rango de rutas metabólicas. Existen tres

formas relacionadas del enzima málico, la que interesa en este caso es la dependiente de NADP, la cual tiene una preferencia por NADP y la capacidad para descarboxilar el oxalacetato.

Se ha detectado un locus activo de esta enzima dimérica en el músculo de los individuos de las poblaciones estudiadas.

El alelo *ME-100** que aparece en los dos subgéneros, está más representado en el subgénero *Tlaloc* y donde se expresa con la frecuencia más alta es en Selegua y Grande. Aparece con frecuencias elevadas en Comalatengo y Chiapas. Con frecuencia media en Atoyac7. Con frecuencia baja en Nentón y Virgen; y con frecuencia muy baja en Polochic.

El alelo *ME-85**, que se expresa tan sólo en el subgénero *Profundulus*, aparece con frecuencia media en Manialtepec, y con frecuencia muy baja en Atoyac1.

El alelo *ME-90** aparece en los dos subgéneros y está más representado en el subgénero *Profundulus* donde se expresa en todas las poblaciones con la frecuencia más alta excepto: en Polochic, Atoyac1 y Quetzala, donde aparece con frecuencia muy elevada; en Mixteco1 y Mixteco2 donde se da con frecuencia elevada; y en Manialtepec y Atoyac7 donde se da con frecuencia media. Dentro del subgénero *Tlaloc* se expresa con una frecuencia media en Virgen y con una frecuencia baja en Chiapas y Jerónimo.

El alelo *ME-95** se expresa tan sólo en el subgénero *Profundulus* y aparece con una frecuencia baja en las poblaciones de Mixteco2 y Mixteco1. En Quetzala aparece con frecuencia muy baja.

El alelo *ME-105** se expresa exclusivamente en poblaciones del subgénero *Tlaloc*. Así se da en Nentón y Jerónimo con una frecuencia elevada y en Comalatengo y Virgen con una frecuencia baja.

Genotipo en <i>ME*</i>	Poblaciones
105/105	Jer, Com, Nen
100/100	Ato7, Gra, Chi, Com, Sel, Pol
100/105	Vir, Nen
95/95	Mix2, Que
90/90	Ato1, Ato2, Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix1, Mix2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Vir, Pol
90/105	Jer
90/95	Mix1
85/85	Man
85/90	Ato1

4.1.10. PMI (Manosa-6-fosfato isomerasa. N°.C.E. 5.3.1.8)

Esta enzima tiene varios nombres alternativos: Fosfomanosa isomerasa, fosfomanosa hexoisomerasa y fosfohexomutasa. Es la enzima que cataliza la interconversión de manosa-6-fosfato. En eucariotas, está involucrada en la síntesis de GDP-manosa.

Se observa un locus de esta enzima de estructura monomérica en el músculo de los individuos de las poblaciones estudiadas.

El alelo *MPI-100** aparece en los dos subgéneros. Se expresa con la frecuencia más alta en Ato4, Ato5, Ato7, Ato8, Mix2, Jer, Sel y Gran; con frecuencia elevada en Ato6, Com y Nen; con frecuencia baja en Grijalva y con frecuencia muy baja en Atoyac1.

El alelo *MPI-80** es un alelo raro en la población Atoyac1, del subgénero *Profundulus*.

El alelo *MPI-83** es un alelo exclusivo de la población del Virgen, subgénero *Tlaloc*, donde se presenta con frecuencia elevada.

El alelo *MPI-85* se presenta con la frecuencia más alta en las poblaciones de Atoyac2, Atoyac3, Mixteco1, Manialtepec y Colotepec1. Aparece con una frecuencia elevada en Colotepec2 y Coyul; con frecuencia media en Atoyac1 y con frecuencia baja en Grijalva.

El alelo *MPI-87** se expresa con la frecuencia más alta en Guacalate, Polochic, Bravo, Tehuantepec1, Tehuantepec2, Chacalapa, Noviller, Tolimán, Pichuacan, Quetzala, Papagayo1 y Papagayo2; con frecuencia media en Grijalva y Atoyac1; con frecuencia baja en Atoyac6, Colotepec2 y Coyul. Estos dos últimos alelos se expresan tan sólo en el subgénero *Profundulus*.

El alelo *MPI-90** aparece únicamente en poblaciones del subgénero *Tlaloc*. Con la frecuencia más alta en la población de Chiapas, y con frecuencia baja en Comalatengo, Nentón y Virgen.

Genotipo en <i>MPI*</i>	Poblaciones
100/100	Ato1, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix2, Gri, Jer, Gra, Com, Sel, Nen
90/90	Chi, Com, Vir, Nen
90/100	Com, Nen
87/87	Ato1, Ato6, Que, Pic, Col2, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Pol
85/85	Ato1, Ato2, Ato3, Mix1, Man, Col1, Col2, Coy, Gri
85/87	Ato1, Coy
80/87	Ato1

Genotipo en <i>MPI</i> *	Poblaciones
80/85	Ato1
83/83	Vir
83/90	Vir

4.1.11. PGI (Glucosa-6-fosfato isomerasa N°.C.E. 5.3.1.9)

Enzima conocida, además, como fosfoglucosa isomerasa, fosfohexosa isomerasa, fosfohexomutasa, oxoisomerasa, hexosefosfatoisomerasa, fosfosacaromutasa, fosfoglucoisomerasa y fosfohexoisomerasa.

PGI (Achari *et al.*, 1981; Smith y Doolittle, 1992) es una enzima dimérica que cataliza la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. PGI está implicada en diferentes rutas metabólicas de organismos superiores. Se detectan dos loci en el músculo de los individuos de todas las poblaciones estudiadas.

El alelo *PGI-1-100** es el más común de todos los alelos de este locus en el género *Profundulus*. Aparece con la frecuencia más alta en todas las poblaciones estudiadas excepto en Atoyac1 y Pichuacan, donde se expresa con frecuencia muy elevada; Tehuantepec1, Quetzala, Atoyac8 y Virgen donde se presenta con frecuencia elevada; Guacalate, Mixteco2 y Novillero, donde se expresa con frecuencia media y en Chiapas se expresa con frecuencia baja. En Coyul, Papagayo1 y Papagayo2 no se expresa.

El alelo *PGI-1-50** aparece con frecuencia media en Mixteco2 y baja en Atoyac8.

El alelo *PGI-1-70** se expresa con frecuencia muy baja en Novillero y Atoyac1.

El alelo *PGI-1-120** se expresa con frecuencia baja en Tehuantepec1 y Novillero.

El alelo *PGI-1-125** es un alelo exclusivo de Guacalate, donde se expresa con frecuencia media. Estos cuatro últimos alelos escasamente representados se dan únicamente en poblaciones del subgénero *Profundulus*.

El alelo *PGI-1-130**, que se expresa en los dos subgéneros, se presenta con la frecuencia más alta en Papagayo1 y Coyul; con frecuencia elevada en Papagayo2 y Chiapas; con frecuencia baja en Quetzala y Virgen y, con frecuencia muy baja, en Pichuacan.

El alelo *PGI-1-140** se expresa tan sólo en el subgénero *Profundulus* y es exclusivo de la población Papagayo2, donde se da con frecuencia baja.

El alelo *PGI-2-100**, se da en poblaciones de los dos subgéneros. Está presente con una la frecuencia más alta en Guacalate, Polochic, Chacalapa, Atoyac4, Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Mixteco2 y Virgen; con frecuencia muy elevada en Chiapas; con frecuencia elevada en Tehuantepec2. Y con frecuencia baja en Atoyac3 y Atoyac8; y en Jerónimo y Grande se expresa con frecuencia muy baja.

El alelo *PGI-2-70** es un alelo raro de Atoyac8.

El alelo *PGI-2-85** se presenta con una la más alta frecuencia en Atoyac2 y Mixteco1; con frecuencia elevada en Atoyac3; con frecuencia media en Atoyac8; con frecuencia baja en Tehuantepec1 y muy baja en Tehuantepec2.

El alelo *PGI-2-90** es un alelo raro de Atoyac8.

El alelo *PGI-2-110** es un alelo raro de Tehuantepec. Estos cuatro últimos alelos se expresan únicamente en el subgénero *Profundulus*.

El alelo *PGI-2-115** es un alelo raro de Chiapas, subgénero *Tlaloc*.

El alelo *PGI-2-130** es el más común dentro de los de este locus, se expresa en los dos subgéneros. Se da con la frecuencia más alta en Novillero, Tolimán, Grijalva, Manialtepec, Pichuacán, Quetzala, Comalatengo y Nentón; con una frecuencia muy elevada en Jerónimo, Selegua y Grande; con frecuencia elevada en Tehuantepec1; con una frecuencia media en Bravo y Atoyac8; con una frecuencia baja en Tehuantepec2 y muy baja en Chiapas.

El alelo *PGI-2-135**, se da en los dos subgéneros aunque está escasamente representado en *Tlaloc*. Aparece con la frecuencia más alta en Coyul, Colotepec2, Atoyac1 y Papagayo1; con frecuencia elevada en Papagayo2; media en Colotepec1. Y con frecuencia muy baja en Bravo y Selegua. Es un alelo exclusivo de esta última población.

El alelo *PGI-2-140**, está reoesentado únicamente en poblaciones del subgénero *Profundulus*. Se expresa con frecuencia media en Colotepec1 y baja en Bravo y Papagayo2.

Genotipo en <i>PGI-1*</i>	Genotipo en <i>PGI-2*</i>	Poblaciones
140/140	135/135	Pap2
130/130	135/135	Coy, Pap1, Pap2
130/130	140/140	Pap2
130/130	130/130	Que
130/130	100/100	Chi, Vir
130/130	100/115	Chi
125/125	100/100	Gua
120/120	130/130	Nov
100/100	140/140	Col1, Bra
100/100	135/135	Ato1, Col1, Col2, Sel
100/100	130/130	Ato8, Que, Pic, Man, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Bra, Jer, Gra, Com, Sel, Nen
100/100	100/100	Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Mix2, Cha, Teh2, Gua, Chi, Vir, Pol
100/100	85/85	Ato2, Ato3, Ato8, Mix1

Resultados

Genotipo en <i>PGI-1*</i>	Genotipo en <i>PGI-2*</i>	Poblaciones
100/130	130/130	Que, Pic
100/130	100/100	Vir
100/125	100/100	Gua
100/120	130/130	Nov
100/120	85/130	Teh1
100/100	135/140	Col1
100/100	130/140	Bra
100/100	130/135	Bra
100/100	100/130	Jer, Gra
100/100	85/130	Ato8, Teh2
70/70	---	Nov
70/100	135/135	Ato1
50/50	70/90	Ato8
50/100	100/100	Mix2
50/100	130/130	Ato8
50/100	100/100	Ato8
50/100	85/100	Ato8

4.1.12. PGM (Fosfogluco-mutasa. N°.C.E. 5.4.2.2)

Conocida también como glucosa-fosfomutasa. Es responsable de la conversión de D-glucosa 1-fosfato en D-glucosa-6-fosfato. Participa tanto en la ruptura como en la síntesis de glucosa. Esta enzima también se expresa en músculo y tiene una estructura de tipo monomérico, de sencilla interpretación.

El alelo *PGM-97** se presenta en los dos subgéneros. Es el más común y aparece con la frecuencia más alta en todas las poblaciones excepto en Bravo, Colotepec1, Atoyac1 donde se expresa con frecuencia muy elevada; en Guacalate, Tolimán, Papagayo1 y Virgen se expresa con frecuencia elevada y no se expresa en Mixteco1, Atoyac2, Atoyac3, Jerónimo, Selegua, Comalatengo, Grande y Nentón. Dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo exclusivo de Chiapas y Virgen.

El alelo *PGM-90** se presenta con frecuencia baja y es un alelo exclusivo de la población del Guacalate, subgénero *Profundulus*.

El alelo *PGM-93** se presenta en los dos subgéneros. Aparece con la frecuencia más alta en Jerónimo, Selegua, Comalatengo, Chiapas y Virgen; y es alelo un alelo raro de la población del río Bravo.

El alelo *PGM-95** se expresa ta sólo en el subgénero *Profundulus*. Aparece con la frecuencia más alta en Atoyac2, Atoyac3 y Mixtecol; se expresa con frecuencia baja en Papagayol y muy baja Colotepec1.

El alelo *PGM-98** está escasamente representado en los dos subgéneros. Tiene una frecuencia baja en Virgen y Tolimán y muy baja en Atoyac 1. Dentro del subgénero *Tlaloc* es un alelo exclusivo de Virgen.

Genotipo en <i>PGM*</i>	Poblaciones
98/98	Ato1, Tol,
97/97	Ato1, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Chi, Vir, Pol
97/98	Ato1, Tol, Vir,
95/95	Ato2, Ato3, Mix1, Col1, Papal
93/93	Jer, Gra, Com, Sel, Nen
Genotipo en <i>PGM*</i>	Poblaciones
93/97	Bra
90/97	Gua

4.1.13. 6PGD (Fosfogluconato deshidrogenasa. N°.C.E. 1.1.1.44)

También se conoce como ácido fosfogluconico deshidrogenasa, 6-fosfogluconico deshidrogenasa y 6-fosfogluconico carboxilasa. Cataliza el tercer paso en la reducción de 6-fosfogluconato en ribulosa-5-fosfato. Enzima con estructura de tipo dimérico y que se expresa en el hígado de los individuos de todas las poblaciones estudiadas.

El alelo *6PGD-100** se expresan en los dos subgéneros. Es el más común de todos, aparece en todas las poblaciones con las frecuencias más altas, elevadas y medias excepto en Grijalva, Chiapas y Virgen.

El alelo *6PGD-95** se presenta en los dos subgeneros. En Atoyac8 con frecuencia baja y en Comalatengo con frecuencia muy baja.

El alelo *6PGD-102** aparece en poblaciones de los dos subgéneros con frecuencia variable en Guacalate, Bravo, Tehuantepec, Chacalapa, Tolimán, Grijalva, Coyul, Colotepec1, Colotepec2, Atoyac1, Manialtepec, Quetzala, Papagayol, Mixtecol, Atoyac3, Jerónimo, Grande y Virgen.

El alelo *6PGD-104** es un alelo exclusivo de Virgen y Chiapas, subgénero *Tlaloc*. En el primero se expresa con frecuencia baja y en el segundo con la frecuencia más alta.

Resultados

Genotipo en 6PGD *	Poblaciones
104/104	Chi
102/102	Ato1, Ato2, Mix1, Que, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Tol, Gri, Pap1, Gua, Bra, Jer, Gra, Vir
102/104	Vir
100/100	Ato1, Ato2, Ato3, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mix1, Mix2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Coy, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Jer, Gra, Com, Sel, Nen, Pol
95/95	Ato8, Com
95/100	Ato8

4.1.14. SOD (Superóxido-dismutasa, N°.C.E. 1.15.1.1)

SOD es una de las formas que presenta una de las enzimas que cataliza los cambios de los superóxidos radicales. Enzima con una estructura de tipo dimérico. Solamente se expresa un locus en el hígado de todas las especies de este estudio. Vig *et al.* (1989) purificaron y caracterizaron Cu,Zn-superoxido dismutasa del hígado de carpa (*Cyprinus carpio* L.).

El alelo *SOD-100** es el más común de todos, se presenta en poblaciones de los dos subgéneros. Se expresa con la frecuencia más alta en todas las poblaciones excepto en Bravo, Atoyac4 y Atoyac8 donde se presenta con una frecuencia elevada. Con frecuencia media en Atoyac5 y Atoyac6; con frecuencia muy baja en Atoyac7 y Selegua. No se expresa en Coyul, Mixteco1, Atoyac2, Atoyac3, Jerónimo, Comalatengo, Grande, Nentón, Chiapas y Virgen.

El alelo *SOD-10**, presente en los dos subgéneros, se expresa con una frecuencia elevada en Grande; media en las poblaciones de Selegua, Comalatengo, y Nentón; baja en Jerónimo y Atoyac8, donde además es exclusivo dentro del subgénero *Profundulus*.

El alelo *SOD-20** es un alelo raro de Atoyac8, subgénero *Profundulus*.

El alelo *SOD-90** es un alelo raro de Comalatengo, subgénero *Tlaloc*.

El alelo *SOD-92** escasamente representado en los dos subgéneros, es un alelo raro de Comalatengo y Coyul.

El alelo *SOD-94**, se expresa únicamente en el subgénero *Profundulus*. Es un alelo fijado en las poblaciones Atoyac2, Atoyac3 y Mixteco1.

El alelo *SOD-96** se presenta únicamente en el subgénero *Tlaloc* y se expresa con una frecuencia elevada en Jerónimo; media en Selegua, Comalatengo y Nentón y baja en Grande.

El alelo *SOD-102**, que se expresa únicamente en el subgénero *Profundulus*, aparece con frecuencia muy elevada en Atoyac7; con frecuencia elevada en Coyul; media en Atoyac5 y Atoyac6; con frecuencia baja en Bravo, Atoyac4 y Atoyac8.

El alelo *SOD-105** es un alelo exclusivo de Comalatengo, subgénero *Tlaloc*, donde se expresa con frecuencia baja.

El alelo *SOD-108** es un alelo raro de Coyul, subgénero *Profundulus*.

El alelo *SOD-115**, que se expresa tan sólo en poblaciones del subgénero *Tlaloc*, está fijado en las poblaciones del Virgen y Chiapas, dato muy importante ya que, como se ha señalado antes, los ejemplares del Chiapas son de una población próxima a la *terra typica* de *P. hildebrandi*, y los ejemplares del Virgen son de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*.

Genotipo en <i>SOD*</i>	Poblaciones
115/115	Chi, Vir
105/105	Com
102/102	Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Coyul, Bra
100/100	Ato1, Ato4, Ato5, Ato6, Ato7, Ato8, Mixt2, Que, Pic, Man, Col1, Col2, Cha, Teh1, Teh2, Nov, Tol, Gri, Pap1, Pap2, Gua, Bra, Se, Pol
100/102	Ato6,
96/96	Jer, Com, Sel, Nen
96/105	Com
94/94	Ato2, Ato3, Mix1
92/108	Coy
92/96	Com
90/96	Com
20/100	Ato8
10/10	Gra, Com, Sel, Nen
10/100	Ato8
10/96	Jer, Gra, Com, Sel, Nen

4.2. Caracterización de las poblaciones a partir de datos aloenzimáticos

Si se agrupan las poblaciones por subgénero se observa la existencia de un alelo marcador entre las especies del subgénero *Tlaloc*, el *IDH-M-95**; este subgénero tiene además dos alelos

exclusivos: *AAT-3-103** y *FUM-115**. El subgénero *Profundulus* presenta los alelos exclusivos *AAT-1-90** y *IDH-1-90**.

Examinando las poblaciones individualmente:

- Guacalate (*terra typica* de *P. guatemalensis*) presenta el alelo fijado *LDH-2-130** y dos alelos exclusivos: *PGI-1-125** y *PGM-90**;
- Polochic presenta un alelo exclusivo, *EST-1-105**;
- Bravo (*terra typica* de *P. scapularis*), tiene a *PGM-93** como alelo raro;
- Novillero tiene un alelo exclusivo, *PGI-1-70**;
- Coyul presenta los alelos raros *SOD-92** y *SOD-108**;
- Tehuantepec1 presenta dos alelos exclusivos, *IDH-2-110** y *LDH-1-112**;
- Tehuantepec2 un alelo fijado, *AAT-2-60**; un alelo exclusivo *AAT-1-93**; y dos alelos raros, *EST-1-80** y *PGI-2-110**;
- Atoyac1 presenta cuatro alelos raros *EST-1-98**, *EST-2-80**, *MDH-1-100** y *MPI-1-80**;
- Atoyac4 el alelo exclusivo *AK-110**;
- Atoyac5 es la única población con alelo nulo, es el alelo raro *IDH-H-0**;
- Atoyac7 el alelo exclusivo *LDH-2-70**;
- Atoyac8 tiene cuatro alelos exclusivos: *AAT-1-80**, *IDH-2-89**, *6PGD-95** y *SOD-10**; y cuatro alelos raros: *MDH-2-140**, *PGI-2-70**, *PGI-2-90** y *SOD-20**;
- Quetzala tiene dos alelos exclusivos, *EST-1-110** y *EST-2-110**;
- Mixteco2 presenta como alelo exclusivo el *AAT-1-70**;
- Papagayo1 (*terra typica* de *P. balsanus*) tiene dos alelos exclusivos *AK-102** y *LDH-2-102**;
- Papagayo2, un alelo exclusivo, *PGI-1-140**;
- Jerónimo (*terra typica* de *P. labialis*) tiene los alelos exclusivos *MDH-2-140** y *EST-2-90**, y el alelo raro *IDH-2-120**;
- Selegua tiene el alelo fijado *IDH-2-80** y los alelos exclusivos *MDH-2-100**, *PGI-2-135** y *SOD-100**;
- Virgen (*terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*), tiene tres alelos exclusivos: *AAT-1-90**, *MPI-83** y *PGM-98**;
- Comalatengo presenta los alelos exclusivos *6PGD-95** y *SOD-105**, y los alelos raros *SOD-90**, *SOD-92** y *FUM-107**;
- Grande presenta el alelo raro *MDH-2-132**;
- Nentón (*terra typica* de *P. candalarius*) tiene los alelos exclusivos *EST-1-100**, *FUM-130** y *LDH-2-105**, además de los raros *EST-1-90** y *LDH-1-5**;
- Chiapas (*terra typica* de *P. hildebrandi*) presenta el alelo exclusivo *IDH-2-90** y los alelos raros *AAT-1-95**, *FUM-100** y *PGI-2-115**.

Entre los distintos conjuntos de poblaciones que comparten alelos, destacan los siguientes:

- Dentro del subgénero *Profundulus*:
 - Las poblaciones de *P. guatemalensis* (Guacalate, *terra typica* de *P. guatemalensis*, y Polochic) presentan un alelo marcador: *LDH-1-10**.
 - El conjunto de poblaciones que presuntamente pertenecen a la especie *P. punctatus* no comparte ningún alelo propio.
 - Las poblaciones Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8 y Mixteco2, que proceden de arroyos de las tierras altas de la región Mixteca entre los 1600 y los 2300 metros sobre el nivel del mar y una población de las tierras bajas de la misma región a una altitud de 700 metros (Atoyac4), presentan el alelo fijado *LDH-1-50** y el alelo exclusivo *IDH-2-70**.
 - Las poblaciones Ato2, Ato3 (procedentes del tramo medio del río Atoyac) y Mix1 (población del arroyo Tlaxiaco), presentan el alelo fijado *SOD-94**.
- Dentro del subgénero *Tlaloc*:
 - Las poblaciones de *P. labialis* no presentan ningún alelo marcador, eso sí, Jerónimo (*terra typica* de *P. labialis*), Selegua y Comalatengo presentan un alelo fijado, el *CK-97**;
 - Las poblaciones de *P. candalarius*: Grande y Nentón (*terra typica* de *P. candalarius*) comparten el alelo exclusivo *CK-105**;
 - *P. labialis* y *P. candalarius* comparten el alelo exclusivo *AAT-1-105**;
 - Cabe destacar que las poblaciones de Chiapas (próximo a la *terra typica* de *P. hildebrandi*) y Virgen (como se ha visto antes, *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*) presentan el alelo fijado *EST-2-100**, y los alelos exclusivos *AAT-1-100**, *AAT-1-110**, *6PGD-104**, *PGI-1-130**, *PGM-1-97* y *SOD-115**;
 - Las poblaciones de *P. labialis*, excepto Virgen, y las de *P. candalarius* comparten el alelo fijado *PGM-93** y los alelos exclusivos *EST-2-95**, *MPI-100**, *6PGD-100**, *SOD-10** y *SOD-96**.

4.3. Caracterización de los individuos de las poblaciones a partir de los datos de secuencias que codifican para las ATPasas 6 y 8

Las secuencias de ADN mitocondrial se obtuvieron a partir de un total de 33 individuos de los cuales 2 fueron utilizados como grupo, externo tal y como se explica en el apartado de material y métodos. Las secuencias completas de los haplotipos de cada individuo se muestran en el Anexo 3 alineadas frente a los grupos externos, *Fundulus heteroclitus* y *Skiffia bilineata* (población Lebrija y Lerma, respectivamente).

La región secuenciada de los genes que codifican para la ATPasa 6 y 8 contiene 850 caracteres (bases nucleotídicas). La frecuencia de las bases relativa para el total del conjunto de datos fue: 29,55% A; 31,83% T; 27,11 C; 11,51% G. En el total de las sustituciones identificadas, el número de transiciones (Ts) fue más alto que el de transversiones (Tv), con una relación Ts/Tv de 3,3177.

Por otro lado, el conocimiento actual de la evolución del citocromo b en peces indica que los cambios en la tercera posición del codón se saturan demasiado rápido y puede contribuir a un ruido filogenético significativo entre las comparaciones divergentes (Murphy y Collier, 1997). Pensando en que pudiera ocurrir lo mismo en la ATPasa 6 y en la ATPasa 8, se analizó la posible saturación de las bases en las tres posiciones (Figura 2a).

Cuando se representan las transiciones y las transversiones observadas frente a las divergencias de las secuencias (distancias no corregidas) para los genes analizados se encuentra una relación relativamente lineal en las primeras, segundas y terceras posiciones (ver Figuras 2b, 2c y 2d). Por lo general, las terceras posiciones son más variables que las primeras posiciones, las cuales son a la vez más variables que las segundas posiciones. Esto está basado, como era de esperar, en la redundancia del código genético. Así, se observa una ligera señal de saturación en las transiciones de las terceras posiciones. Las tasas de transición y transversión derivadas de las comparaciones entre pares de *taxa* varían de acuerdo con la posición de cada codón. El codón de terminación de la ATPasa 8 para este caso se encuentra en la posición 166-168. El codón de comienzo de la ATPasa 6 se encuentra en la posición 159-161.

De los 850 caracteres obtenidos, 133 no proporcionaron información en el análisis de parsimonia, del resto 411 (48,35%) fueron constantes y 306 (42,7%) fueron informativos para la parsimonia. Dado que el test de partición de homogeneidad mostraba diferencias no significativas entre datos de individuos ($p=1$), toda la información de estos genes fueron analizados y presentados juntos.

2a)

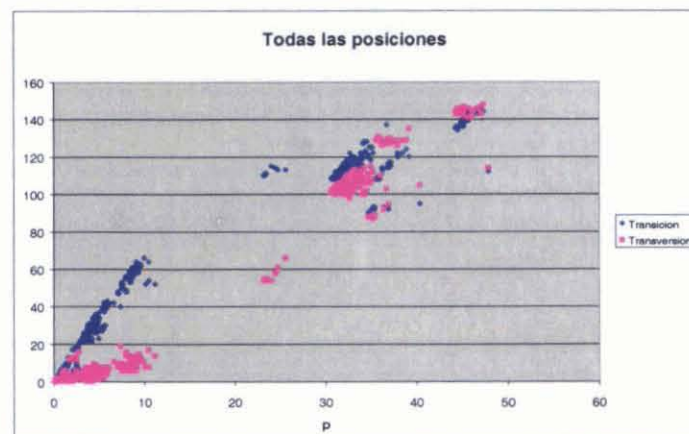
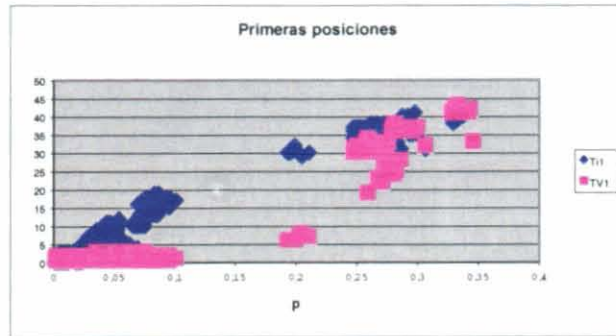
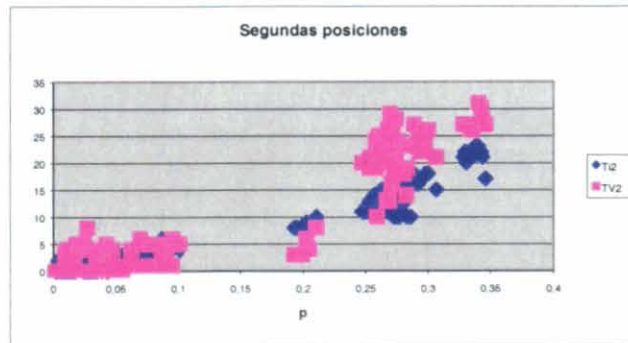


Figura 2: Curva de saturación de los genes que codifican para las ATPasa 6 y 8 teniendo en cuenta las sustituciones debidas a las transiciones (Ti) y a las transversiones (Tv) representadas frente a las distancias no corregidas (p).

2b)



2c)



2d)

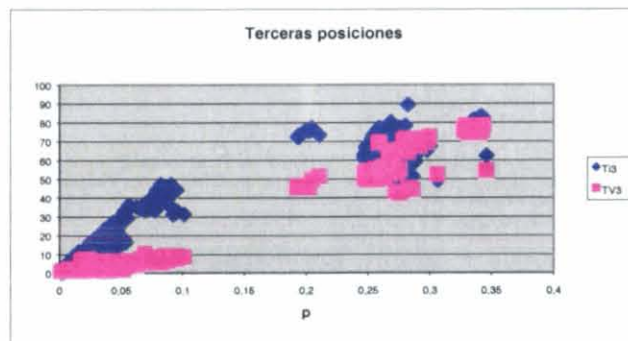


Figura 2: Curva de saturación de los genes que codifican para las ATPasa 6 y 8 teniendo en cuenta las sustituciones debidas a las transiciones (Ti) y a las transversiones (Tv) representadas frente a las distancias no corregidas (p).

Según el programa MODELTEST 3.0 (Posada y Crandall, 1998), el modelo seleccionado al que mejor se ajustan los datos de secuencias es el HKY+G. El valor de *gamma* (0.434) da idea de la tasa de homogeneidad específica de cada sitio. Así, de acuerdo a una distribución *gamma*, se asigna a cada sitio una tasa diferente de heterogeneidad.

4.4. La variabilidad genética nuclear

En la tabla 4, aparecen los parámetros de variabilidad genética calculados a partir de datos aloenzimáticos.

El número medio de alelos por locus varía entre 1,1 y 1,9. El valor más bajo se obtiene en Guacalate, Polochic y Pichuacan, y el valor más alto en Atoyac1 y Atoyac8. La media es 1,34.

El porcentaje de loci polimórficos oscila entre 9,5% (Polochic y Pichuacan) y 61,9 % (Atoyac8). La media es 25,2%.

Los valores obtenidos para las heterocigosis observadas oscilan entre 0 y 0,119. Las poblaciones con una heterocigosis observada igual a 0 son las de Grijalva, Polochic y Atoyac4; las poblaciones con la heterocigosis observada más alta son Atoyac8 (0,119), Nentón (0,098) y Virgen (0,095). La media es de 0,041.

Existe una correlación positiva, a un nivel de significación del 99%, entre el tamaño de la muestra y el número medio de alelos por locus ($r=0,436$, $p=0,010$); correlación que no se da entre el tamaño de la muestra y el porcentaje de loci polimórficos ($r=0,312$, $p=0,073$) ni entre el tamaño medio de la muestra y la heterocigosis observada ($r=0,278$, $p=0,113$).

Por subgéneros, el más variable es *Tlaloc* con un número medio de alelos por locus de 1,429; un porcentaje de loci polimórficos de 31,3% y una heterocigosis observada de 0,068, frente a 1,315; 23,619% y 0,034 del subgénero *Profundulus*, respectivamente. En este caso, los tres parámetros difieren significativamente para un nivel de significación del 95% (para el número medio de alelos por locus $p=0,038$; para el porcentaje de loci polimórficos $p=0,042$; y, para la heterocigosis observada $p=0,003$).

Por especies, los parámetros de variabilidad genética de *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi* son mayores que los de *P. punctatus* y *P. guatemalensis*, como puede observarse en la siguiente tabla. Estas diferencias no son significativas ni para el número medio de alelos por locus $p=0,333$ ni para el porcentaje de loci polimórficos $p=0,297$. La diferencia sí es significativa para la heterocigosis observada $p=0,020$).

Población	n	A	P95	Ho	He
Gua	18,5	1,1	14,3	0,050	0,048
Pol	12,2	1,1	9,5	0,000	0,014
Bra	19,3	1,5	23,8	0,077	0,097
Tol	19,6	1,2	19,0	0,030	0,077
Nov	13,7	1,2	19,0	0,010	0,074
Cha	14,9	1,3	19,0	0,025	0,061
Coy	9,9	1,4	28,6	0,049	0,067
Teh1	3,8	1,3	23,8	0,048	0,099
Teh2	19,8	1,3	14,3	0,014	0,065
Col1	22,1	1,4	28,6	0,048	0,090
Col2	20,6	1,3	28,6	0,043	0,096
Man	4,0	1,2	19,0	0,083	0,104
Ato1	35,9	1,9	33,3	0,047	0,112
Ato2	5,0	1,2	19,0	0,038	0,070
Ato3	9,4	1,3	28,6	0,024	0,096
Ato4	9,5	1,2	19,0	0,000	0,049
Ato5	10,0	1,2	14,3	0,010	0,076
Ato6	10,2	1,3	23,8	0,035	0,097
Ato7	12,2	1,4	33,3	0,040	0,094
Ato8	10,0	1,9	61,9	0,119	0,178
Pic	12,5	1,1	9,5	0,007	0,034
Que	13,6	1,5	38,1	0,051	0,130
Mix1	5,0	1,2	19,0	0,010	0,086
Mix2	7,0	1,2	19,0	0,041	0,064
Pap1	18,6	1,4	33,3	0,010	0,099
Pap2	9,0	1,2	23,8	0,016	0,061
Gri	9,8	1,2	14,3	0,000	0,050
Jer	20	1,5	42,9	0,079	0,096
Sel	15,7	1,2	19,0	0,036	0,055
Vir	14,0	1,4	28,6	0,095	0,127
Com	14,9	1,6	28,6	0,052	0,112
Gra	18,8	1,3	23,8	0,058	0,062
Nen	20,6	1,5	42,9	0,098	0,127
Chi	17,1	1,5	33,3	0,058	0,089
Leb	18,4	1,3	28,6	0,087	0,099

Tabla 4: datos relativos a variabilidad genética. n=número medio de muestras por locus, A=número medio de alelos por locus, P95=porcentaje de loci polimórficos al 95%, Ho=heterocigosidad observada, He= heterocigosidad esperada.

En la tabla 5 también aparecen los valores de variabilidad genética de las poblaciones Atoyac4, Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8 y Mixteco2, todas ellas procedentes de arroyos de las tierras altas de la región Mixteca, y que presentan un alelo fijado (de aquí en adelante se denominará a este conjunto de poblaciones grupo *mixteco*); y también aparecen los valores de variabilidad genética de las poblaciones Atoyac2, Atoyac3 y Mixteco1, procedentes de arroyos de las tierras altas-medias de la región Mixteca, y que presentan un alelo fijado (de aquí en adelante se denominará a este conjunto de poblaciones grupo *oaxacae*, por agruparse en torno a Atoyac 3, próxima a la *terra typica* de *P. oxacae*). Además se ha incluido la variabilidad genética de *P. hildebrandi* teniendo en cuenta a las poblaciones de Chiapas y Virgen (ésta última población aunque procede de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*, presenta un alelo fijado que comparte con *P. hildebrandi*).

Resultados

Especie	A	P95	Ho
<i>P. guatemalensis</i>	1,1	11,900	0,025
<i>P. punctatus</i>	1,323	23,977	0,034
<i>P. labialis</i>	1,425	29,775	0,066
<i>P. candalarius</i>	1,400	33,35	0,078
<i>P. hildebrandi</i>	1,5	33,3	0,058
Virgen y Chiapas	2	31	0,077
Grupo <i>oaxacae</i>	1,23	22,2	0,024
Grupo <i>mixteca</i>	1,36	28,6	0,041

Tabla 5: datos relativos a variabilidad genética por especie y grupos de poblaciones. A=número medio de alelos por locus, P95=porcentaje de loci polimórficos al 95%, Ho=heterocigosidad observada.

Para estudiar si existe diferencia en la variabilidad genética entre las poblaciones que ocupan diferentes nichos (Nevo, 1978), se han agrupado las mismas en: un primer grupo con poblaciones que habitan pequeños ojos de agua (Tehuantepec1, Tehuantepec2, Atoyac1, Atoyac2, Atoyac3, Atoyac4, Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Mixteco1 y Nentón), un segundo grupo con poblaciones de lago (Mixteco2) y un tercer grupo con poblaciones de río (el resto de poblaciones). En la tabla 6 aparecen los valores de variabilidad genética, todos ellos valores muy parecidos. Tras realizar las comparaciones pertinentes mediante el test de la ANOVA de Kruskal-Wallis, se puede concluir que no se han encontrado diferencias significativas entre los valores del número medio de alelos por locus ($p=0,4351$), porcentaje de loci polimórficos al 95% ($p=0,615$) y heterocigosidad observada ($p=0,135$) de los diferentes grupos.

Grupos	A	P95	Ho
1	1,34	24,66	0,03
2	1,2	19	0,04
3	1,34	25,75	0,05

Tabla 6: datos relativos a variabilidad genética por grupos según nicho ocupado. Grupo 1=ojos de agua, grupo 2=lagos, grupo 3=ríos. A=número medio de alelos por locus, P95=porcentaje de loci polimórficos al 95%, Ho=heterocigosidad observada.

En las poblaciones estudiadas aparecen un total de 255 loci polimórficos, de los cuales 39 no se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que supone el 15,3%. En todos estos casos el desequilibrio es debido a un déficit de heterocigotos, produciéndose unas diferencias muy significativas ($p=0,000$) entre la heterocigosidad observada y la esperada. Las desviaciones, con un nivel de significación del 99%, se dan las poblaciones de los siguientes loci:

- AAT-1 en Tehuantepec2;
- AAT-2 en Atoyac3;
- AAT-3 en Colotepec1, Atoyac1, Atoyac8 y Novillero;

- AK en Papagayo1 y Atoyac4;
- CK en Grijalva, Pichuacan y Papagayo1;
- EST-1 en Novillero y Quetzala;
- FUM en Tolimán, Colotepec2, Atoyac1, Atoyac5 y Atoyac6;
- LDH-1 en Chiapas;
- LDH-2 en Papagayo1;
- MDH-2 en Jerónimo;
- ME en Atoyac7, Comalatengo y Chiapas;
- PMI en Grijalva y Colotepec2;
- 6PGD en Chacalapa, Tolimán, Atoyac1, Quetzala, Jerónimo y Grande;
- PGI-1 en Novillero y Chiapas;
- PGI-2 en Tehuantepec2, Colotepec1;
- PGM en Papagayo1; y
- SOD en Bravo y Atoyac5.

De los 7140 pares de loci analizados, sólo 267 (el 3,74%) mostraron un desequilibrio de ligamiento estadísticamente significativo al 5% del nivel de significación, por lo tanto, se puede decir que, globalmente, la independencia entre loci no puede ser rechazada (Semerikov *et al.*, 1999).

4.5. F de Wright

Como se comentó en el apartado de materiales y métodos, para la valoración del flujo genético entre las poblaciones y especies estudiadas se llevó a cabo el estudio de los estadísticos F de Wright (1965).

Antes de comenzar a exponer los resultados, cabe señalar que todos los valores de F_{st} obtenidos y comentados a continuación son significativos ($p < 0,000$). En la tabla 7, aparece la media de los valores de F_{st} , que es muy elevada (0,838). La media de los valores de F_{it} (0,914) también es alta, e indica una subdivisión en grupos de la población total. Es lógico encontrarse estos valores altos y positivos cuando se tratan en conjunto todas las especies. También es alta y elevada la media de los valores de F_{is} (0,469), el coeficiente de endogamia, lo que indica la existencia de un cruzamiento entre individuos emparentados, y como consecuencia un déficit en el número de heterocigotos.

Los valores de F_{st} por cuencas son muy elevados (Tabla 8), salvo en el caso de la cuenca del Colotepec (0,165) que cuenta con dos poblaciones de la misma especie. La cuenca del Papagayo, también tiene dos poblaciones de la misma especie, aún así el valor de la F_{st} es medio-alto (0,300). El elevado valor del Grijalva-Usumacinta (0,789) se justifica porque lo habitan poblaciones pertenecientes a *P. punctatus*, *P. labilais*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*,

Resultados

por lo que se supone que hay interrupción de flujo génico; pero, ¿qué sucede con las cuencas Atoyac-Verde, Mixteco y Tehuantepec?. Estas cuencas poseen unas F_{st} muy elevadas: 0,727; 0,857; 0,797 y 0,567, respectivamente, y en princpio están habitadas exclusivamente por poblaciones de *P. punctatus*.

Locus	F(is)	F(it)	F(st)
AAT-1	0,103	0,851	0,834
AAT-2	0,230	0,835	0,785
AAT-t	0,863	0,989	0,921
AK-01	0,870	0,952	0,628
CK-01	0,628	0,969	0,916
EMU-1	0,718	0,967	0,883
EMU-2	0,270	0,879	0,834
FUM-1	0,882	0,976	0,800
IDH-M	1,000	1,000	0,986
IDH-H	0,156	0,766	0,723
LDH-1	0,951	0,995	0,897
LDH-2	0,490	0,929	0,861
MDH-M	-0,007	0,911	0,912
MDH-H	0,333	0,869	0,804
ME-01	0,601	0,906	0,764
MPI-1	0,496	0,933	0,867
PGD-6	0,883	0,957	0,631
PGI-1	0,214	0,763	0,699
PGI-2	0,329	0,908	0,864
PGM-1	0,161	0,928	0,915
SOD-1	0,476	0,892	0,794
Media	0,469	0,914	0,838

Tabla 7: valores de F de Wright para el conjunto de poblaciones.

Cuenca	F(is)	F(it)	F(st)	%F(is)	%F(st)
Tehuantepec	0,585	0,821	0,567	50,781	49,219
Grijalva-Usumacinta	0,306	0,853	0,789	27,945	72,055
Colotepec	0,498	0,581	0,165	75,113	24,887
Papagayo	0,832	0,882	0,300	73,498	26,502
Atoyac	0,572	0,883	0,727	44,034	55,966
Mixteco	0,631	0,925	0,797	44,188	55,812

Tabla 8: valores de F de Wright para poblaciones agrupadas por cuencas.

Por especies (Tabla 9), se encuentran valores de F_{st} más bajos entre las poblaciones que, en principio, pertenecen a *P. candalarius* (0,213) que entre las poblaciones que, en principio, pertenecen a *P. punctatus* (0,764), *P. guatemalensis* (0,756) y *P. labialis* (0,671) lo que parece

indicar que estas tres especies engloban poblaciones que pueden comportarse de un modo independiente y/o especies distintas. Si de entre las poblaciones de *P. labialis* se extrae la población Virgen, el resto de las poblaciones presenta una F_{st} de 0,421. Las poblaciones del grupo *mixteco* tienen un valor de F_{st} de 0,408. Las poblaciones del grupo *oaxacae* tienen una F_{st} de 0,315. Las poblaciones de Chiapas (próximo a la *terra typica* de *P. hildebrandi*) y Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*) que presentan dos alelos fijados y cinco alelos exclusivos tienen un valor de F_{st} de 0,414.

Especies o grupos	F(is)	F(it)	F(st)	%F(is)	%F(st)
<i>P. guatemalensis</i>	0,162	0,796	0,756	17,647	82,353
<i>P. punctatus</i>	0,568	0,898	0,764	42,643	57,357
grupo <i>mixteco</i>	0,537	0,726	0,408	56,825	43,175
grupo <i>oaxacae</i>	0,688	0,786	0,315	68,594	31,406
<i>P. labialis</i> - Vir	0,345	0,621	0,421	45,039	54,961
<i>P. candalarius</i>	0,147	0,329	0,213	40,833	59,167
Chi + Vir	0,283	0,553	0,414	40,603	59,397
<i>P. labialis</i>	0,289	0,766	0,671	30,104	69,896

Tabla 9: valores de F de Wright para poblaciones agrupadas por especies o por grupos de poblaciones que comparten alelos.

Se ha utilizado la relación $\%F_{is} + \%F_{st} = 100$ para conocer como contribuye cada una de las F de Wright en la estructuración de los grupos de poblaciones; así, la estructura de las poblaciones de las especies del subgénero *Tlaloc* se debe, en mayor medida, a la interrupción del flujo génico que a la existencia de cruzamientos entre individuos emparentados: 69,9% en *P. labialis* y 59,17% en *P. candalarius*. Lo mismo sucede en la estructuración de las poblaciones de *P. punctatus* (57,36%) y de *P. guatemalensis* (82,35%). Si de entre las poblaciones de *P. labialis* se extrae la población Virgen, la contribución de la F_{st} en la estructuración de las poblaciones disminuye al 54,96%. La estructuración de las poblaciones del grupo *mixteco* se debe más a la existencia de cruzamientos entre individuos que a la interrupción del flujo génico 43,17%. La estructuración del grupo *oaxacae* se debe también a lo mismo (31,41%). En las poblaciones de Chiapas (próximo a la *terra typica* de *P. hildebrandi*) y Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*) la contribución de la F_{st} a la estructuración de las poblaciones es de 59,4%.

4.6. Las distancias genéticas

En lo que a electroforesis de proteínas se refiere, y como se ha comentado en el apartado de material y métodos, en este estudio se ha trabajado con tres distancias, la de Nei (1972) (Anexo 4), la de Rogers (1972) (Anexo 5) y la de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (Anexo 6). Esta última incorpora asunciones realistas desde el punto de vista biológico sobre la naturaleza de los cambios evolutivos que modifican las frecuencias génicas (Swofford *et al.*, 1996) y por eso se ha escogido para realizar todas las comparaciones entre las poblaciones de las dos vertientes, de los dos subgéneros, de las distintas cuencas y de especies diferentes. La distancia genética propuesta por Nei, aunque presenta ciertos problemas matemáticos al poder

dar lugar a árboles con ramas negativas, tiene una característica que la hace favorable: el posibilitar la comparación con numerosos estudios donde se emplea, por lo que se ha utilizado para realizar las comparaciones pertinentes con datos que aparecen en la literatura del apartado de discusión. La distancia de Rogers se ha utilizado para agrupar las poblaciones mediante el método UPGMA y compararlo con la agrupación resultante de las distancias de Cavalli-Sforza y Edwards.

En cuanto a las distancias basadas en las secuencias de ADNmit cabe decir que se han utilizado el valor de las distancias absolutas y el de las distancias no corregidas (Anexo 7 y Anexo 8).

Antes de exponer las distancias, cabe señalar que existe una correlación positiva entre las distancias absolutas y las no corregidas ($r=0,980$, $p=0,000$); las distancias absolutas y las de Cavalli-Sforza y Edwards ($r=0,789$, $p=0,000$) y entre las no corregidas y las de Cavalli-Sforza y Edwards ($r=0,803$, $p=0,000$).

Así, cabe señalar que todas las distancias (Anexos 3 y 5) se distribuyen en un rango entre $D_{CS}=0,106$ ($D_{Nei}=0,010$) y $D_{CS}=0,835$ ($D_{Nei}=1,955$), en torno a la media $D_{CS}=0,568$ ($D_{Nei}=0,685$). La primera distancia del rango se produce entre Atoyac5 y Atoyac6, poblaciones pertenecientes a la misma especie, *P. punctatus*, a la misma cuenca, Atoyac-Verde, y a la misma vertiente, la pacífica; y la última entre Coyul y Grande, poblaciones de dos especies distintas, *P. punctatus* y *P. candalarius*, dos cuencas, Coyul y Grijalva-Usumacinta, y dos vertientes, Pacífico y Atlántico, respectivamente.

Las poblaciones de la vertiente pacífica y las de la atlántica distan $D_{CS}=0,704$ ($D_{Nei}=1,130$). La vertiente pacífica tiene una media de distancias de $D_{CS}=0,465$ ($D_{Nei}=0,349$), ligeramente menor a la de la vertiente atlántica $D_{CS}=0,569$ ($D_{Nei}=0,702$), aún así esta diferencia es significativa ($p=0,003$).

Por cuencas, cabe decir que la mayor de las medias de las distancias de las cuencas que tienen más de una población estudiada es la del Mixteco $D_{CS}=0,666$ ($D_{Nei}=0,856$), siendo una cuenca con dos poblaciones, que en principio pertenecen a *P. punctatus*. Hay que resaltar el elevado valor de las distancias entre estas dos poblaciones. Las menores de las medias de las distancias corresponden a la cuenca del Colotepec $D_{CS}=0,183$ ($D_{Nei}=0,040$) y Papagayo $D_{CS}=0,264$ ($D_{Nei}=0,074$) que son dos cuencas, con dos poblaciones cada una, que pertenecen a *P. punctatus*. La cuenca del Grijalva-Usumacinta, la del Tehuantepec y la del Atoyac-Verde tienen valores intermedios, $D_{CS}=0,534$ ($D_{Nei}=0,613$), $D_{CS}=0,424$ ($D_{Nei}=0,283$) y $D_{CS}=0,473$ ($D_{Nei}=0,460$), respectivamente. La primera de ellas alberga poblaciones pertenecientes a *P. punctatus*, *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*, la segunda y la tercera tienen poblaciones pertenecientes a *P. punctatus*. Cabe señalar el elevado valor de la media de las distancias de estas dos últimas cuencas en comparación a las anteriormente comentadas. Las diferencias entre las distancias de las poblaciones de las cuencas Grijalva-Usumacinta y Atoyac-Verde son significativas ($p=0,003$).

Por otro lado, la media de las distancias que separan las poblaciones de los dos subgéneros de *Profundulus* es de $D_{CS}=0,764$ ($D_{Nei}=1,337$). La media de las distancias dentro del subgénero *Profundulus* es de $D_{CS}=0,469$ ($D_{Nei}=0,352$) y la del subgénero *Tlaloc* de $D_{CS}=0,457$ ($D_{Nei}=0,376$); diferencia no significativa ($p=0,827$).

Entre el total de las especies, existen lógicas diferencias significativas ($p=0,041$), siendo mayores las distancias que se dan entre los grupos de poblaciones de especies de diferentes subgéneros (Tabla 10): *P. punctatus* y *P. labialis* $D_{CS}=0,769$ ($D_{Nei}=1,357$), *P. candaliarius* $D_{CS}=0,775$ ($D_{Nei}=1,390$) y *P. hildebrandi* $D_{CS}=0,747$ ($D_{Nei}=1,280$); y entre las poblaciones de *P. guatemalensis* y *P. labialis* $D_{CS}=0,723$ ($D_{Nei}=1,190$), *P. candaliarius* $D_{CS}=0,732$ ($D_{Nei}=1,168$) y *P. hildebrandi* $D_{CS}=0,680$ ($D_{Nei}=0,942$). Las menores distancias son las existentes entre las especies del mismo subgénero *P. guatemalensis* y *P. punctatus* $D_{CS}=0,498$ ($D_{Nei}=0,388$); y dentro del subgénero *Tlaloc* no se producen diferencias significativas ($p=0,097$) de las distancias entre diferentes especies. Las distancias entre *P. hildebrandi* y *P. candaliarius* $D_{CS}=0,673$ ($D_{Nei}=0,727$) y *P. labialis* $D_{CS}=0,558$ ($D_{Nei}=0,560$) son elevadas a pesar de tratarse de especies pertenecientes al mismo subgénero. La distancia entre *P. labialis* y *P. candaliarius* es de $D_{CS}=0,413$ ($D_{Nei}=0,252$).

La media de las distancias entre los grupos de poblaciones de *P. punctatus* $D_{CS}=0,464$ ($D_{Nei}=0,347$) es mayor que la de *P. guatemalensis* $D_{CS}=0,392$ ($D_{Nei}=0,212$), *P. labialis* $D_{CS}=0,457$ ($D_{Nei}=0,355$) y *P. candaliarius* $D_{CS}=0,229$ ($D_{Nei}=0,055$), siendo significativa la diferencia entre las poblaciones de *P. punctatus* y *P. labialis* significativa ($p=0,008$). Este dato no puede ser obtenido para *P. hildebrandi* ya que en principio sólo se dispone de una población que la representa.

	<i>P. guatemalensis</i>	<i>P. labialis</i>	<i>P. candaliarius</i>	<i>P. hildebrandi</i>
<i>P. punctatus</i>	0,498	0,769	0,775	0,747
<i>P. guatemalensis</i>		0,723	0,732	0,68
<i>P. labialis</i>			0,413	0,558
<i>P. candaliarius</i>				0,673

Tabla 10: distancias de cuerda de Cavalli-Sforza entre especies.

Las poblaciones del grupo *mixteco* tienen una $D_{CS}=0,262$ ($D_{Nei}=0,083$). Las poblaciones del grupo *oaxacae* tienen una $D_{CS}=0,218$ ($D_{Nei}=0,059$). Las poblaciones de Chiapas (próximo a la *terra typica* de *P. hildebrandi*) y Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*) tienen una $D_{CS}=0,336$ ($D_{Nei}=0,171$). Si de entre las poblaciones de *P. labialis* se extrae la población Virgen, el resto de las poblaciones presentan una $D_{CS}=0,308$ ($D_{Nei}=0,106$).

En cuanto a las distancias de los datos moleculares cabe decir que las distancias absolutas (dab) se distribuyen en un rango entre 1 y 234, en torno a una media de 108,845 (Anexo 7). Las distancias no corregidas (div) se distribuyen en un rango entre 0,1% y 28,6% en torno a la media 12,97% (Anexo 8). Las mínimas distancias se dan entre Chacalapa y Tehuantepec2,

ambas poblaciones de *P. punctatus* y pertenecientes a cuencas separadas de la misma vertiente (Anexos 7 y 8). Las máximas, en el caso de las absolutas, entre Atoyac8 y Chiapas, la primera una población de *P. punctatus* y la segunda de *P. hildebrandi* ambas poblaciones que pertenecen a diferentes cuencas en distintas vertientes. En el caso de las divergencias la mayor se da entre Coyul y Jerónimo (*P. punctatus* y *P. labialis*) y es la misma distancia que se da entre Tolimán, Novillero y Lerma (las dos primeras poblaciones de *P. punctatus* y la última de *Skiffia bilineata*, utilizada como grupo externo).

Las poblaciones de la vertiente pacífica y las de la atlántica distan $dab=181,367$ y $div=21,6\%$. La vertiente pacífica tiene una media de distancias $dab=37,667$ y $div=4,5\%$, menor a las de la vertiente atlántica $dab=91,667$ y $div=10,8\%$, siendo estas diferencias significativas ($p=0,000$).

En cuanto a las diferencias de las distancias entre las poblaciones que pertenecen a una misma cuenca, cabe comentar que las divergencias son significativas entre las poblaciones de las cuencas de Grijalva-Usumacinta y las poblaciones de las cuencas del Atoyac-Verde ($p=0,035$) que tienen más de una población ($p=0,538$; $p=0,538$), siendo mayor la del Grijalva-Usumacinta ($dab=65,806$; $div=7,7\%$), seguido de Mixteco ($dab=63$; $div=7,4\%$), Atoyac ($dab=43,6$; $div=5,1\%$), Papagayo ($dab=37$; $div=4,4\%$), Tehuantepec ($dab=18$; $div=2,13\%$) y Chacalapa ($dab=1$; $div=0,1\%$).

Por otro lado, la media de las distancias que separan las poblaciones de los dos subgéneros de *Profundulus* es de $dab=217,82$; $div=22,44\%$. La media de las distancias dentro del subgénero *Profundulus* es de $dab=39,37$; $div=8,76\%$ y la del subgénero *Tlaloc* de $dab=20,5$; $div=10,89\%$, diferencia significativa ($p=0,000$).

Al igual que sucedía con las distancias obtenidas a partir de los datos aloenzimáticos, las diferencias entre las distancias absolutas y las divergencias de los datos de secuenciación son significativas ($p=0,004$), siendo mayores las distancias entre los grupos de poblaciones de especies de diferentes subgéneros: *P. guatemalensis* y *P. hildebrandi* ($dab=229$; $div=26,9\%$), *P. labialis* ($dab=218,7$; $div=25,7\%$) y *P. candalarius* ($dab=217$; $div=25,5\%$); y entre las poblaciones de *P. punctatus* y *P. hildebrandi* ($dab=223,429$; $div=26,6\%$), *P. labialis* ($dab=217,657$; $div=25,9\%$) y *P. candalarius* ($dab=214,762$; $div=25,4\%$) (Tabla 11).

Las menores distancias son las existentes entre las especies del mismo subgénero *P. labialis* y *P. candalarius* ($dab=9,5$; $div=11,2\%$); y dentro de este subgénero son más elevadas las distancias que se dan entre *P. hildebrandi* y *P. labialis* ($dab=50,8$; $div=6\%$) y *P. candalarius* ($dab=46$; $div=5,4\%$). Dentro del subgénero *Tlaloc* se producen diferencias significativas ($p=0,0420$). Las distancias entre los grupos de poblaciones de las especies del género *Profundulus* son también elevadas ($dab=42,190$; $div=5\%$), siendo su diferencia significativa ($p=0,0001$).

dab	<i>P. guatemalensis</i>	<i>P. labialis</i>	<i>P. candalarius</i>	<i>P. hildebrandi</i>
<i>P. punctatus</i>	42,19	217,657	214,762	223,429
<i>P. guatemalensis</i>		218,7	217	229
<i>P. labialis</i>			9,5	50,8
<i>P. candalarius</i>				46

div	<i>P. guatemalensis</i>	<i>P. labialis</i>	<i>P. candalarius</i>	<i>P. hildebrandi</i>
<i>P. punctatus</i>	5	25,9	25,4	26,6
<i>P. guatemalensis</i>		25,7	25,5	26,9
<i>P. labialis</i>			11,2	6
<i>P. candalarius</i>				5,4

Tabla 11: Distancias absolutas y divergencias entre las poblaciones de las distintas especies

En cuanto a la media de las distancias entre los grupos de poblaciones de las distintas especies, cabe señalar que, al igual que en el caso de las distancias de Cavalli-Sforza y Edwards, las de *P. punctatus* (dab=38,862; div=4,69%) son mayores que las de *P. guatemalensis* (dab=27; div=3,2%), *P. labialis* (dab=12,6; div=1,48%) y *P. candalarius* (dab=7; div=0,8%), no siendo estas diferencias significativas ($p=0,366$). Estos datos no pueden ser obtenidos para *P. hildebrandi* porque, en principio, sólo se dispone de una población que representa esta especie. Las poblaciones del grupo *mixteco* (en este caso Atoyac5, Atoyac8 y Mixteco2) presentan una dab=7,3; div=0,72%; y las poblaciones del grupo *oaxacae* (en esta caso Atoyac3, Atoyac9 y Mixteco1) tienen una dab=3; div=0,35%.

4.7 Aproximación macroevolutiva

En los dendrogramas elaborados en este capítulo se ha seguido la taxonomía propuesta por Miller (1955) y aceptada por el resto de los taxónomos.

4.7.1. Métodos basados en distancias

Los dos dendrogramas generados a partir de los coeficientes de distancia distintos, el de Rogers (Figura 3) y el de cuerda de Cavalli-Sforza y Edward (Figura 4), presentan básicamente las mismas relaciones entre *taxa* o poblaciones (OTUs), con algunas pequeñas diferencias en la tipología de los mismos. En las figuras, estas diferencias no se observan en las agrupaciones terminales porque el dendrograma basado en las distancias de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards se ha realizado de una manera más exigente, teniendo en cuenta los valores de *bootstraps* mayores de 50.

Antes de describir los aspectos fundamentales de los dos dendrogramas, y como se ha comentado en el párrafo anterior, cabe recordar que los valores de *bootstraps* de los nodos que

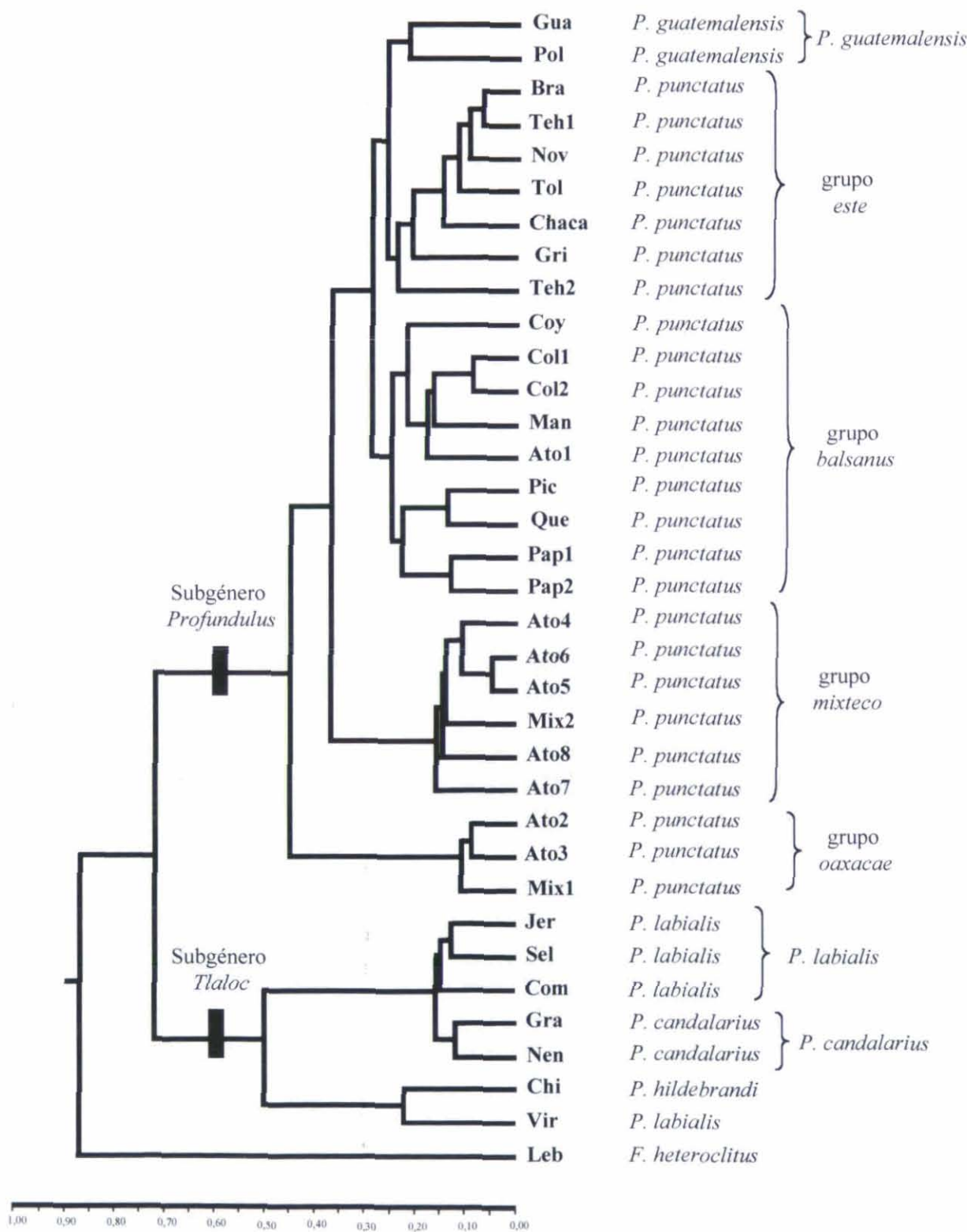


Figura 3: Agrupamiento de las poblaciones de *Profundulus* según UPGMA y las distancias genéticas de Rogers basado en alozimas y siguiendo la taxonomía propuesta por Miller (1955).

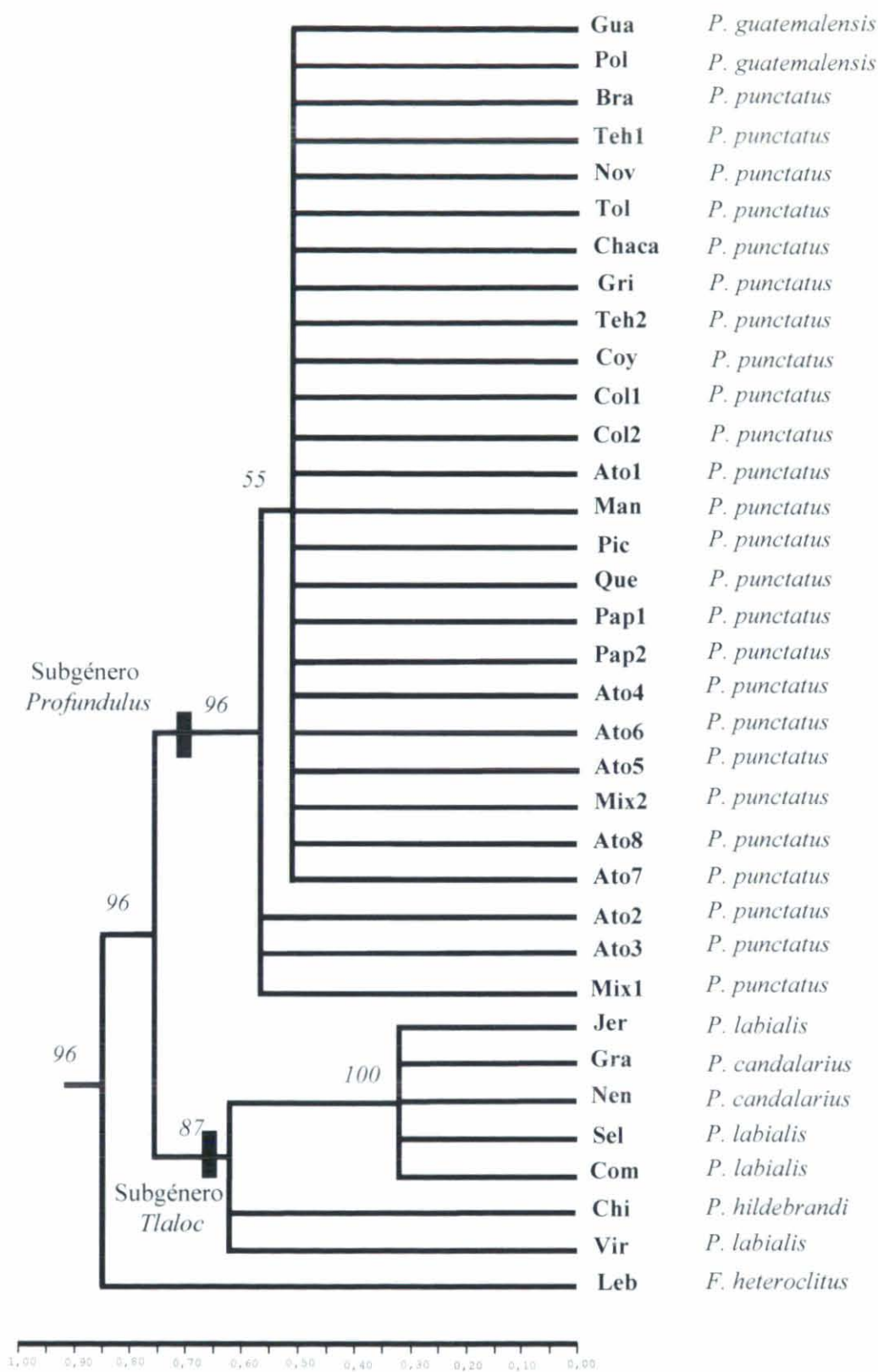


Figura 4: Agrupamiento de las poblaciones de *Profundulus* según UPGMA y las distancias genéticas de de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards basado en alozimas. Los valores de *bootstraps* aparecen en los nodos. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955).

se ofrecen a continuación (entre paréntesis) son generados a partir de las distancias de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards. Así, la población de Lebrija (*Fundulus heteroclitus*), como grupo externo, define la raíz del dendrograma. En la siguiente bifurcación se separan los dos subgéneros, *Profundulus* (96) y *Tlaloc* (87). Las poblaciones del subgénero *Tlaloc* forman dos grupos, un primero donde se incluyen Chiapas (*terra typica* de *P. hildebrandi*) y Virgen (*P. labialis*); y un segundo donde se incluyen Jerónimo, Selegua, Comalatengo, Grande y Nentón (*P. labialis* y *P. candalariae*) (100). Este último grupo se divide en dos subgrupos, uno que recoge las poblaciones de Jerónimo, Grande y Nentón y otro que recoge las poblaciones Selegua y Comalatengo. En el grupo formado por las poblaciones del subgénero *Profundulus* se diferencia una rama que se separa del resto de las poblaciones del subgénero y que reúne las poblaciones de grupo *oaxacae* (Mixteco1, Atoyac2 y Atoyac3, esta última *terra typica* de *P. oaxacae*, sinónimo de *P. punctatus*); a continuación otra rama que agrupa las poblaciones del grupo *mixteco* existentes en la región Mixteca (Atoyac4, Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8 y Mixteco2) (55).

El resto de los grupos que se constituyen a continuación tienen valores bajos de *bootstraps*. Así, las poblaciones que primeramente se diferencian (Figura 3) son Guacalate y Polochic (*P. guatemalensis*). El grupo restante tiene dos ramas, la primera recoge las poblaciones de los tramos bajos de las cuencas pacíficas al oeste del istmo de Tehuantepec (Coyul, Colotepec1, Colotepec2, Manialtepec, Pichuacán, Quetzala, Papagayo1, Papagayo2 y Atoyac1, de aquí en adelante grupo *balsanus* por agruparse en torno a la *terra typica* de *P. balsanus*); y la segunda agrupa las poblaciones de los tramos bajos de las cuencas pacíficas al este del istmo de Tehuantepec y una población de la cuenca del Grijalva-Usumacinta (Tehuantepec1, Tehuantepec2, Bravo, Novillero, Tolimán, Chacalapa y la población Grijalva, de aquí en adelante grupo *este*). Cabe destacar que en este último grupo las dos poblaciones de la cuenca del Tehuantepec no son un grupo hermano. Aquí surge otra diferencia, ya que en el dendrograma generado a partir de la distancia de Rogers (Figura 3) este último grupo se divide en dos ramas, una igual que la anterior con las poblaciones de las cuencas del Coyul, Colotepec, Manialtepec, Pichuacán, Quetzala, Papagayo y la población Atoyac1; y otra con las del Guacalate, Bravo, Tehuantepec1, Tehuantepec2, Novillero, Tolimán, Chacalapa, la población Grijalva y la población Polochic. En este último grupo se separan Guacalate y Polochic del resto. Las poblaciones de *P. guatemalensis* constituyen el grupo hermano de las poblaciones del sur de *P. punctatus*.

Se han obtenido valores significativos de F_{st} al analizar los diferentes grupos de poblaciones. Así, las poblaciones que, según Miller (1955), se incluyeron en la especie *P. punctatus* y que tenían una F_{st} igual a 0,764 se dividen en otros grupos que presentan F_{st} menores: las poblaciones del grupo *oaxacae* tienen una F_{st} de 0,315; las poblaciones del grupo *mixteco* presentan una F_{st} de 0,408; las poblaciones del grupo *este* tienen una F_{st} de 0,599, descendiendo este valor a 0,529 cuando se omite la población Tehuantepec2 (población que presenta un alelo fijado, uno exclusivo y dos raros); y, las poblaciones del grupo *balsanus* tienen una F_{st} de 0,628. El UPGMA agrupa Polochic con Guacalate (*P. guatemalensis*) y presentan un elevado valor de F_{st} (0,756).

La estructuración de las poblaciones del grupo *oaxacae* y la del grupo *mixteco* se debe principalmente a la tendencia a la endogamia, con una contribución de la F_{is} de 68,59% en el primer grupo y de 56,82% en el segundo. En cambio, la estructuración de las poblaciones del grupo *balsanus* se debe principalmente a la interrupción del flujo génico (54,14%). En el caso de las poblaciones del grupo *este* la contribución de los dos valores es similar (F_{st} =48,53%, F_{is} =51,47%).

Utilizando las secuencias de ATPasa 6 y 8 y aplicando el método del vecino más próximo con HYK+G (*Neighbor-Joining*; Saitou y Nei, 1987) se obtiene un dendrograma (el valor de los *bootstraps* entre paréntesis) en el que se separan los grupos externos del resto de las poblaciones (Figura 5). Seguidamente se separan dos grupos, uno basal formado por las poblaciones pertenecientes al subgénero *Tlaloc* (97) y otro con el resto de poblaciones, las pertenecientes al subgénero *Profundulus* (100). Dentro del grupo de las poblaciones de *Tlaloc* aparece una politomía y la separación de un subgrupo con las poblaciones Jerónimo (*terra typica* de *P. labialis*) y Comalatengo (55), ambas poblaciones de *P. labialis*. Dentro del grupo de las poblaciones de *Profundulus* hay una politomía donde se separan las dos poblaciones del Papagayo y los siguientes subgrupos: (82) Tolimán (*terra typica* de *P. punctatus*) y Bravo (*terra typica* de *P. scapularis*), ambas poblaciones de *P. punctatus*; (51) Polochic y Guacalate (*terra typica* de *P. guatemalensis*), ambas poblaciones de *P. guatemalensis*; (98) Tehuantepec1, Grijalva y Novillero, todas ellas poblaciones de *P. punctatus*, siendo la de Grijalva la única que aparece en una localidad de la vertiente atlántica; (100) Colotepec1, Coyul y Manialtepec, todas ellas *P. punctatus*; (89) Atoyac9, Atoyac3 (procedentes del tramo medio del río Atoyac) y Mixteco1 (población del arroyo Tlaxiaco); (99) Atoyac5, Atoyac6, Atoyac8 y Mixteco2, todas ellas poblaciones de *P. punctatus* de arroyos de la región Mixteca; y por último (75) Chacalapa y Tehuantepec2, ambas poblaciones de *P. punctatus* del este del Istmo de Tehuantepec.

4.7.2. Métodos basados en caracteres

4.7.2.1. Método de máxima verosimilitud

Como se ha comentado anteriormente en el apartado de material y métodos, por exigencias del *software* utilizado, solamente se han podido incluir 20 poblaciones de *Profundulus* para elaborar un cladograma a partir de las frecuencias alélicas y mediante máxima verosimilitud. En la reconstrucción de esta filogenia se han utilizado todos los loci analizados en el estudio de variabilidad, y que además se han utilizado en la construcción de los dendrogramas de distancias.

En el dendrograma resultante (Figura 6) se puede observar la separación, a nivel basal, del grupo externo. Posteriormente se separan dos grupo soportados por elevados valores de *bootstraps*, uno de ellos con las poblaciones del subgénero *Tlaloc* (74), y el otro con las poblaciones del subgénero *Profundulus* (100). En cuanto al primero, y teniendo en cuenta que se trabaja con las poblaciones de Chiapas, Comalatengo, Nentón y Jerónimo, se produce la agrupación de Comalatengo, Jerónimo (ambos *P. labialis*) y Nentón (*P. candalarius*) (93),

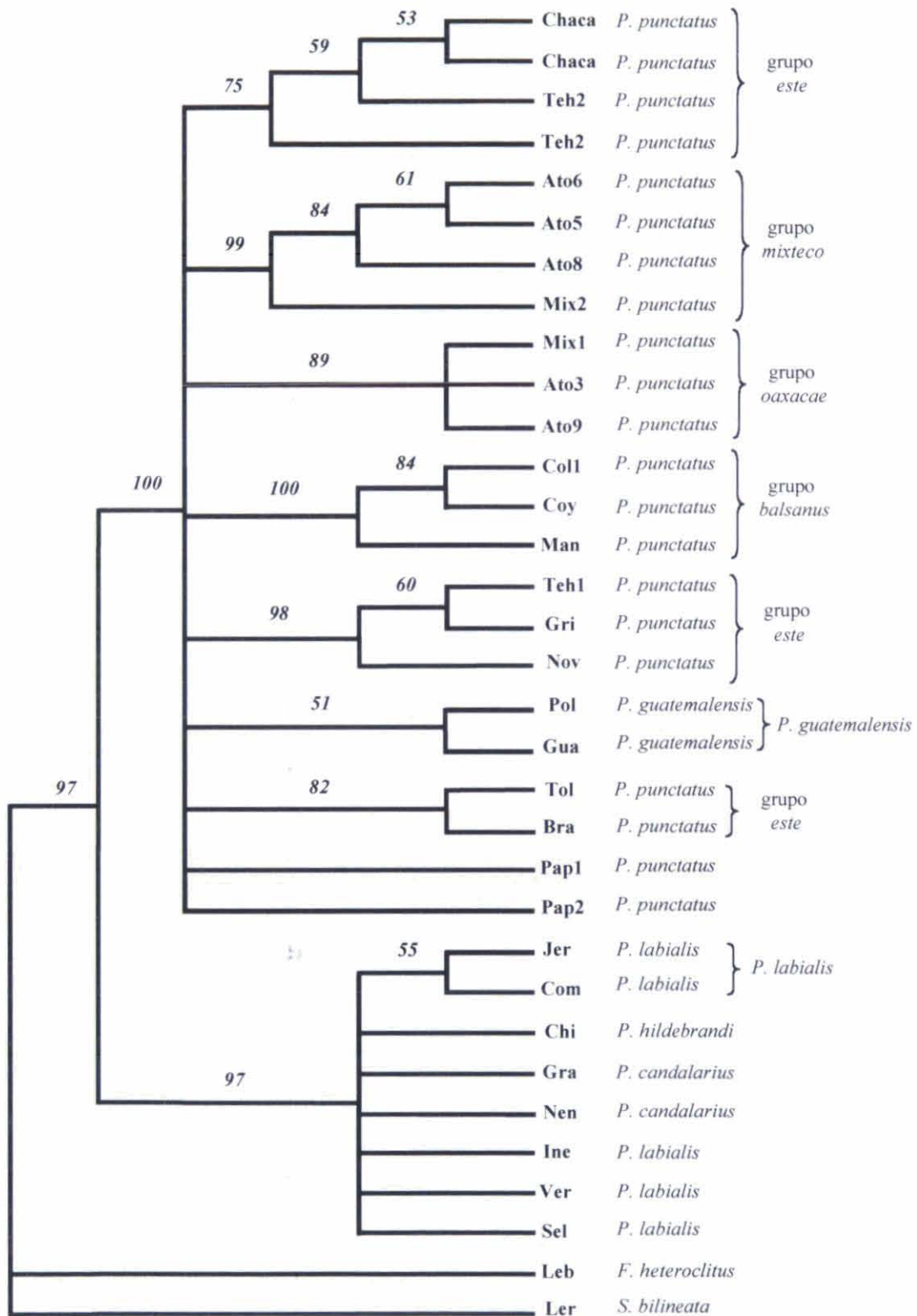


Figura 5: Dendrograma obtenido para los individuos de *Profundulus* aplicando el método del vecino más próximo con el modelo HYK+G (*Neighbor-Joining*; Saitou y Nei, 1987) basado en las secuencias de ATPasa 6 y 8. El valor de los *bootstraps* aparece en la ramas de los distintos grupos. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955).

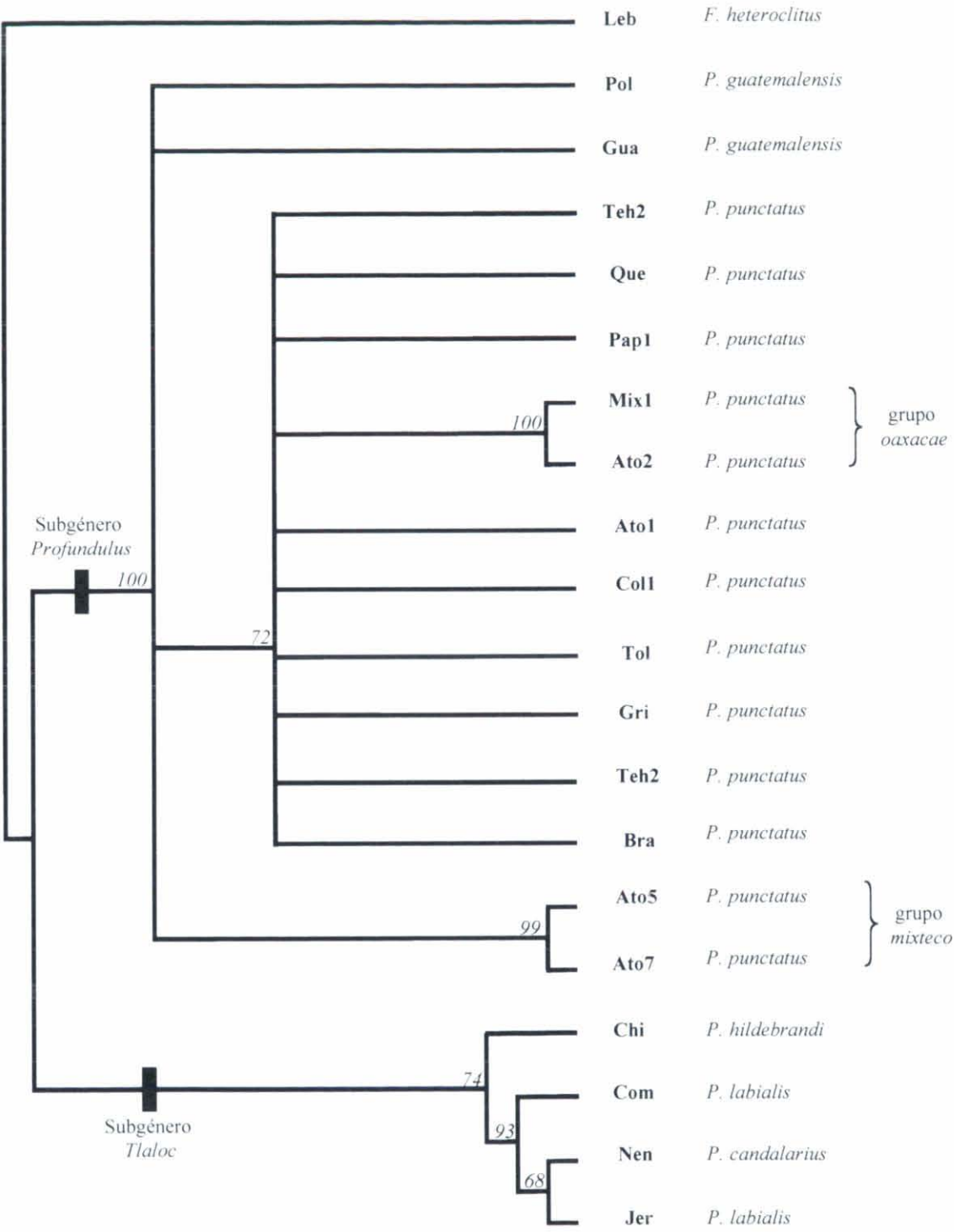


Figura 6: Fenograma obtenido para las poblaciones de *Profundulus* aplicando el método de máxima verosimilitud basado en aloenzimas. El valor de los bootstraps en los nodos. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955).

quedando estas dos últimas poblaciones formando un grupo soportado por valores de *bootstraps* de 68.

En cuanto al grupo de poblaciones del subgénero *Punctatus*, cabe señalar que se produce una politomía de la población Polochic, por un lado, de Guacalate, por otro, las dos poblaciones del grupo *mixteco* (Atoyac5 y Atoyac7) (99), por otro, y un grupo de varias poblaciones soportado por un valor de *bootstraps* de 72. Dentro de este grupo se encuentran el resto de poblaciones de *P. punctatus* formando una politomía, dos de esas poblaciones, las del grupo *oaxacae* (Mixteco1 y Atoyac2), están agrupadas con un valor de *bootstraps* de 100.

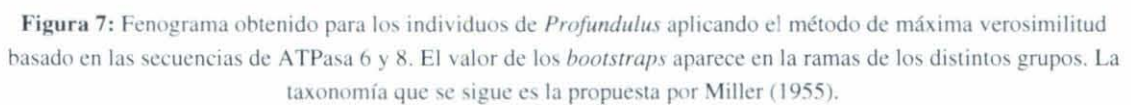
El árbol filogenético obtenido aplicando la secuenciación de la ATPasa 6 y 8 (Figura 7) presenta numerosas politomías pero los grupos terminales están mejor resueltos que en el anterior. Así, en un primer momento, se separa (79) el grupo de las poblaciones del subgénero *Punctatus* del resto de poblaciones, incluidos grupos externos, que constituyen una politomía. Dentro del grupo de poblaciones de *Punctatus* se da otra politomía donde se distinguen los siguientes subgrupos: (89) Tolimán (*terra typica* de *P. punctatus*) y Bravo, ambas poblaciones de *P. punctatus*; (75) poblaciones del grupo *este* (Tehuantepec1, Grijalva y Novillero), todas ellas poblaciones de *P. punctatus*, siendo la de Grijalva la única que aparece en una localidad de la vertiente atlántica; (83) grupo *oaxacae*; (72) Chacalapa y Tehuantepec2, ambas poblaciones de *P. punctatus* del este del Istmo de Tehuantepec; Colotepec1 y Coyul, poblaciones de *P. punctatus*.

4.7.2.2. Inferencia bayesiana

El árbol filogenético obtenido aplicando la secuenciación de los genes que codifican para ATPasa 6 y 8 (Figura 8) soporta a los dos subgéneros de *Profundulus* con un valor de probabilidad posterior de 0,71 para el subgénero *Tlaloc* y de 1 para el subgénero *Profundulus*. La inferencia bayesiana no resuelve la filogenia de las especies del subgénero *Tlaloc*, dando como resultado una politomía. En cuanto al subgénero *Profundulus*, se produce la separación del grupo *mixteco* con una probabilidad posterior de 1. El resto de poblaciones constituye otro grupo (0,80), con una politomía de tres grupos. El primero (0,75), formado por dos subgrupos, uno con Tolimán y Bravo (0,95), y otro (0,80) con las poblaciones del grupo *balsanus* y las de *P. guatemalensis* (0,91). El segundo grupo (1), está formado por Novillero, Tehuantepec1 y Grijalva. El tercer grupo (0,99) se divide en dos subgrupos, uno con las poblaciones del grupo *oaxacae* (1) y otro con Tehuantepec2 y Chacalapa (1).

4.7.2.3. Métodos de máxima parsimonia

Para elaborar esta filogenia, se han utilizado las 20 mismas poblaciones que en el método anterior; además, y por exigencias del *software* empleado, se ha prescindido de IDH-2, el locus más polimórfico y siempre que un taxón tenía dos alelos que no poseían ningún otro taxón más, éstos eran reunidos en un único alelo.



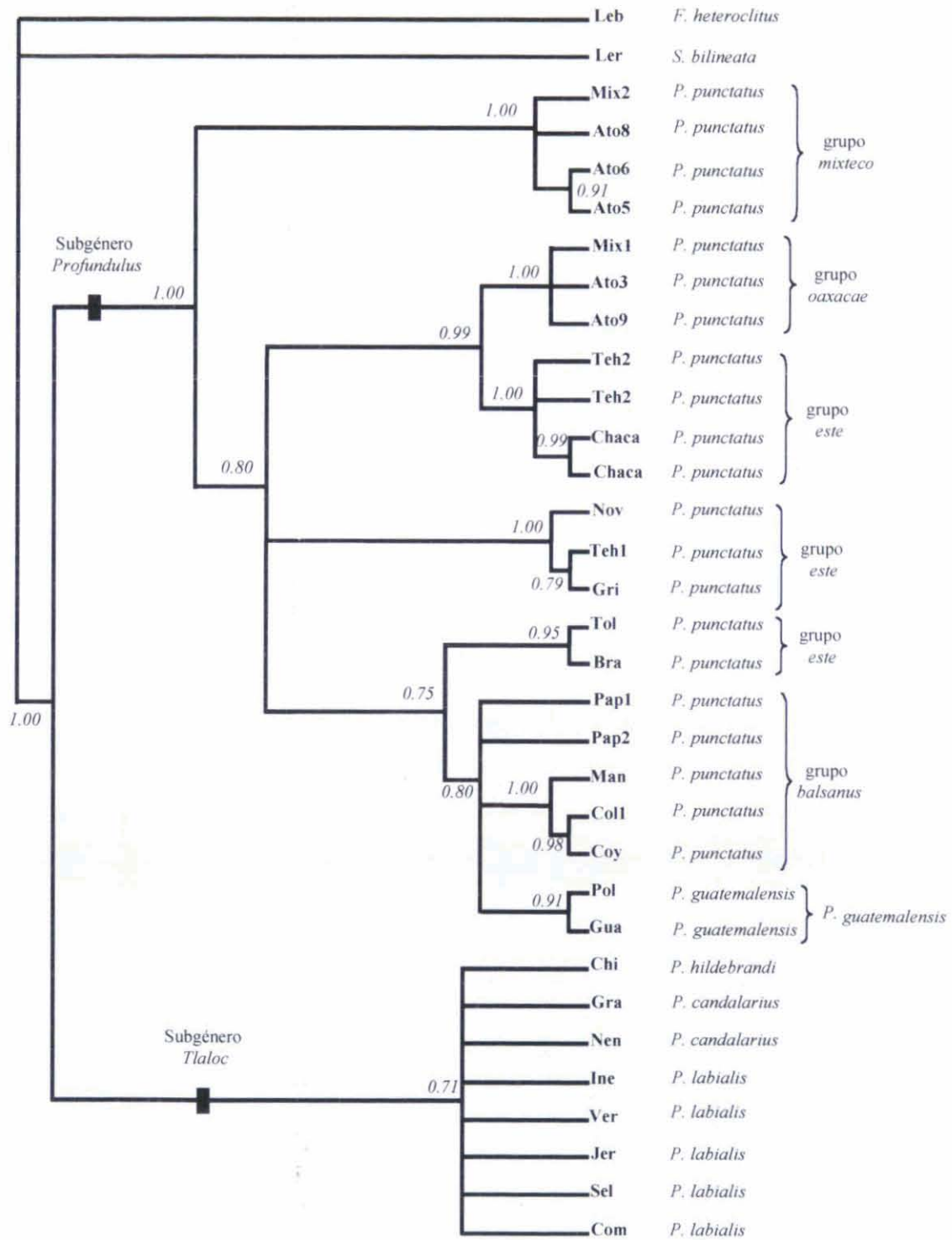
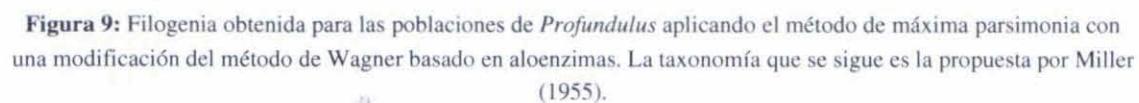


Figura 8: Fenograma obtenido para los individuos de *Profundulus* aplicando la inferencia bayesiana basada en las secuencias de ATPasa 6 y 8. El valor de las probabilidades posteriores aparece en las ramas de los distintos grupos. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955).

La filogenia resultante en la primera estima no proporciona valores de *bootstraps* (Figura 9). A nivel basal se separa el grupo externo, posteriormente es la población Chiapas (*P. hildebrandi*) la que se separa. A continuación, se separa el resto de poblaciones del subgénero *Tlaloc*. Dentro de este grupo, Comalatengo se aparta de Jerónimo y Nentón. Dentro del grupo restante, se separa primero Guacalate y consecuentemente Polochic (*P. guatemalensis*), quedando un conjunto mixto de poblaciones donde se distinguen dos grupos, uno con Tehuantepec2, Atoyac5 y Atoyac7; y otro donde se bifurca primeramente Bravo, después Tehuantepec1, quedando dos grupos de poblaciones, uno con Tolimán, Quetzala y Grijalva y otro con Colotepec1, Papagayo1, Atoyac1, Atoyac2 y Mixteco1.

En la segunda estima se realiza una búsqueda heurística con *bootstraps*. Para evitar el problema que pueda plantear la violación de la asunción de independencia de caracteres, se considera cada locus como carácter multiestado y a las combinaciones alélicas como caracteres de estado. El programa ha realizado matrices de pasos, y del total de 20 caracteres utilizados, todos ellos con el mismo peso y tratados como desordenados, 16 han resultado informativos para el análisis de parsimonia. La filogenia resultante no está bien resuelta (Figura 10). A nivel basal se produce una politomía del grupo externo, la población Chiapas, y un tercer grupo que, con un valor de *bootstraps* de 72, recoge al resto de las poblaciones objeto de análisis. En este grupo se pueden diferenciar dos subgrupos, uno con un valor de *bootstraps* de 88, con las poblaciones de *P. labialis* y *P. candalarius*, y otro con un valor de *bootstraps* de 85 con las poblaciones del subgénero *Profundulus*. Este conjunto de poblaciones se encuentra en politomía cabe destacar la agrupación, con elevados valores de *bootstraps*, de las poblaciones Atoyac5 y Atoyac7 (grupo *mixteco*), por un lado, y de las poblaciones Atoyac2 y Mixteco1 (grupo *oaxacae*), por otro.

El árbol filogenético obtenido de aplicar la máxima parsimonia a los datos de secuencias de ADNmit que codifican para la ATPasa 6 y 8 está mejor resuelto que el anterior, pero no por ello está libre de politomías (Figura 11). En primer lugar se separan las poblaciones de los grupos externos. Posteriormente se obtienen dos grupos: un primer grupo está constituido por las poblaciones pertenecientes al subgénero *Tlaloc* (100), del que se separa en posición basal Chiapas, posteriormente Nentón quedando una politomía de Grande, Santa Inés, El Vergel, Jerónimo, Selegua y Comalatengo (53); un segundo grupo que está constituido por poblaciones del subgénero *Profundulus* (100), en el que en primer lugar se separan las poblaciones del grupo *mixteco* (100) (Atoyac5, Atoyac6, Atoyac8 y Mixteco2). En el grupo restante se produce una dicotomía (98), en primer lugar se separan las poblaciones del grupo *oaxacae* (100) y las poblaciones del grupo *este* (79) (Chacalapa y Tehuantepec2). En el grupo restante (55) se produce una dicotomía y se separan, agrupándose, las poblaciones (98) Tehuantepec1, Novillero y Grijalva, todas ellas poblaciones de *P. punctatus*. El subgrupo restante (59), es una politomía dentro de la cual se agrupa (97) Tolimán y Bravo, (66) Polochic y Guacalate (*P. guatemalensis*) y (99) Colotepec1, Coyul y Manialtepec, quedando las poblaciones del Papagayo sin agrupación alguna.



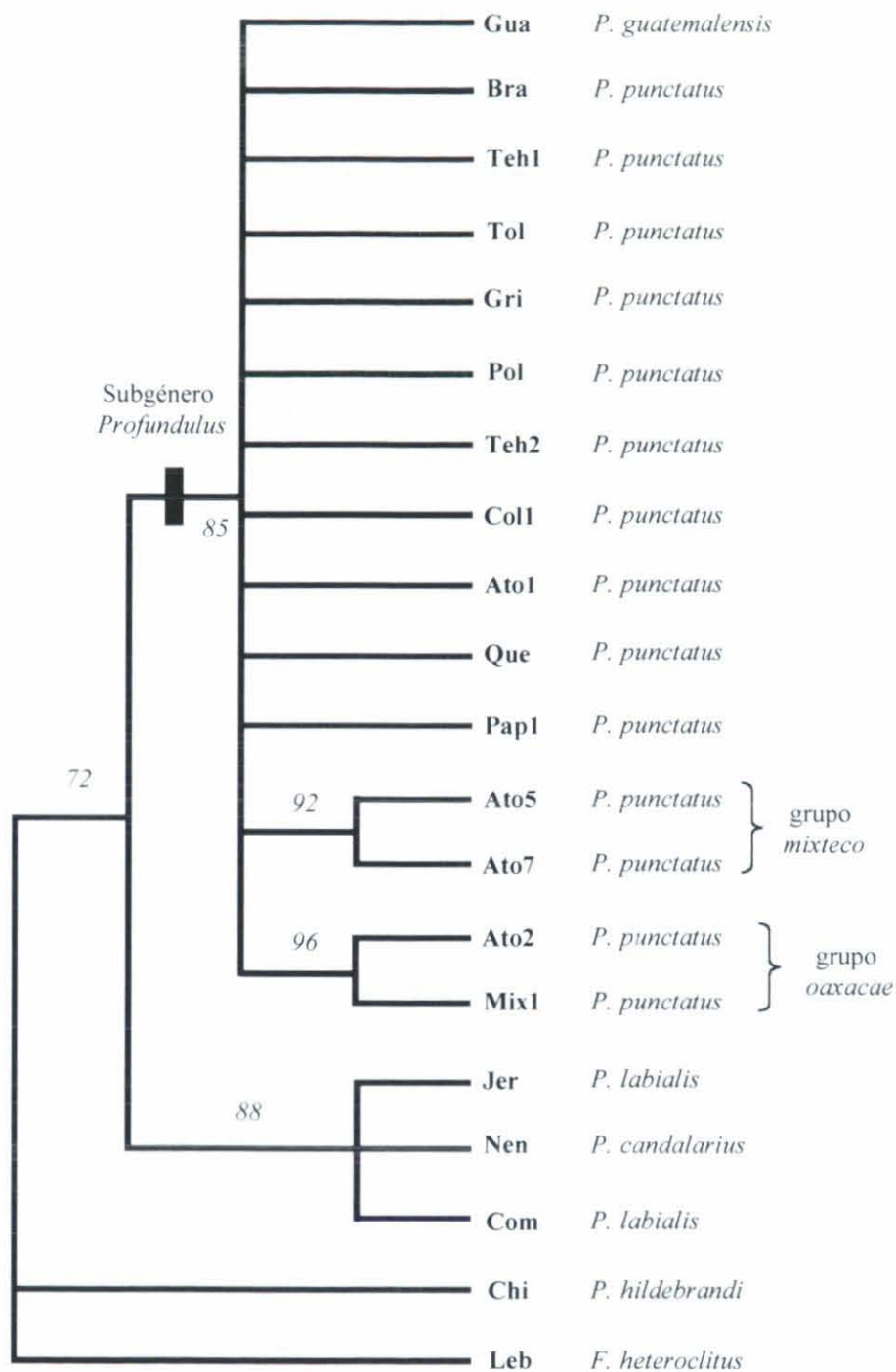


Figura 10: Filogenia obtenida para las poblaciones de *Profundulus* aplicando el método de máxima parsimonia basado en aloenzimas. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955).

Resultados

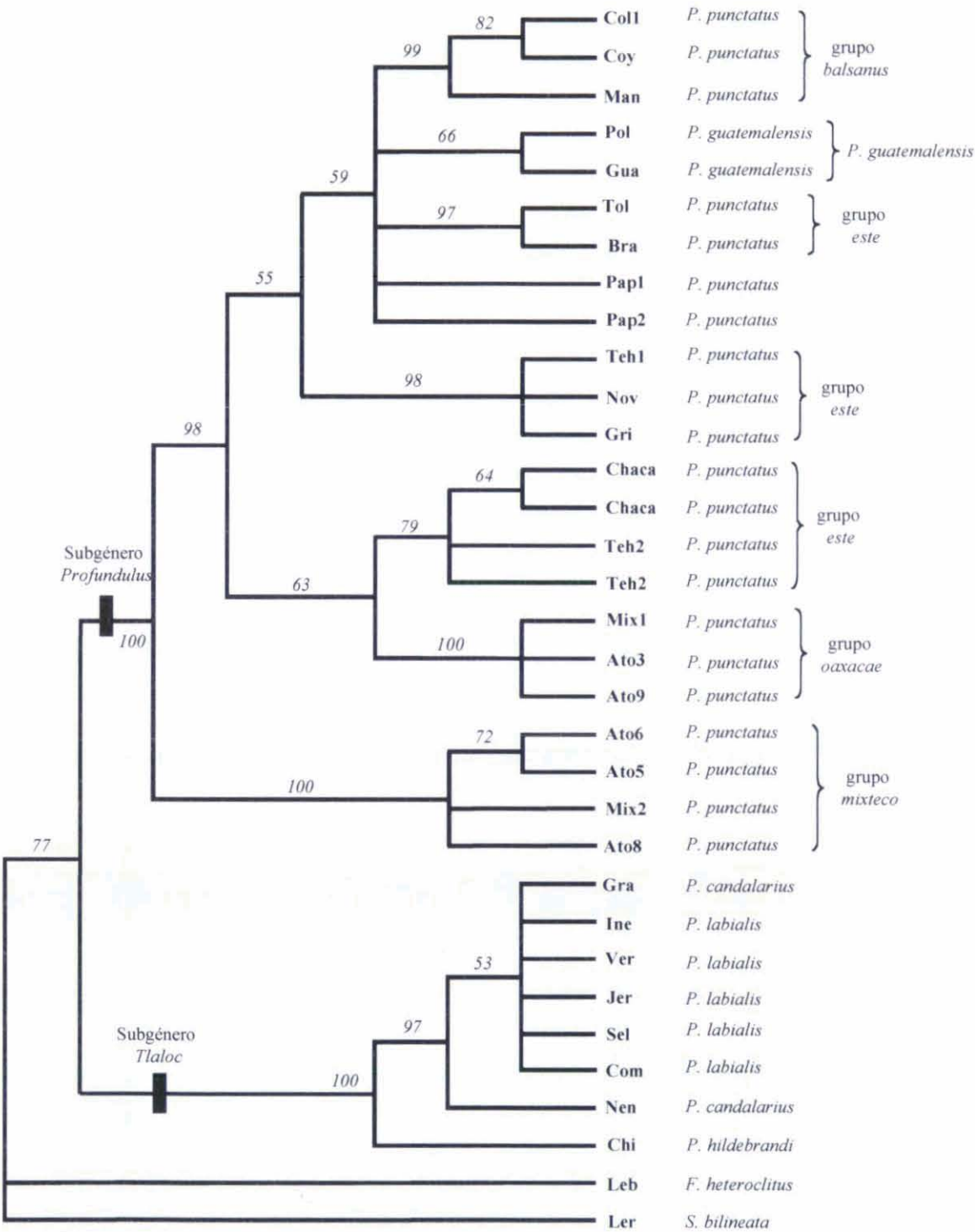


Figura 11: Filogenia obtenida para los individuos de *Profundulus* aplicando el método de máxima parsimonia basado en las secuencias de ATPasa 6 y 8. La taxonomía que se sigue es la propuesta por Miller (1955). El valor de los bootstraps aparece en la ramas de los distintos grupos.

4.8. El reloj molecular

Para conocer cuáles son las poblaciones que presentan una tasa de evolución constante se ha aplicado el programa PHYLTEST (Kumar, 1996). Esas poblaciones son: Mixteco1, Mixteco2, Atoyac3, Atoyac6, Atoyac8, Atoyac9, Tehuantepec1, Tehuantepec2, Papagayo1, Papagayo2, Chacalapa, Novillero, Grijalva, Tolimán, Bravo, Colotepec1, Polochic, Manialtepec, Ines, Vergel, Nentón y Chiapas. Con la finalidad de estimar el tiempo de divergencia aplicando el reloj molecular se han agrupado mediante máxima verosimilitud utilizando el programa PUZZLE (Schmidt *et al.*, 2002).

Para analizar el árbol obtenido (Figura 12) y relacionar las divergencias obtenidas con el tiempo, se ha aplicado una tasa de divergencia de 1,3% por millón de años, citada por varios autores (Bermingham *et al.*, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Machordom y Doadrio, 2001) para los genes que codifican las ATPasas de peces.

Asumiendo esta tasa de divergencia se estimó que en el Mioceno Inferior (22-23 Ma aprox.) se produce la separación de los subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc*.

En el Plioceno Inferior (5 Ma aprox.), y dentro del subgénero *Profundulus* se separan las poblaciones del grupo *mixteco* (Atoyac6, Atoyac8 y Mixteco2) del resto de poblaciones de *P. punctatus* y de la población de *P. guatemalensis*.

Posteriormente, dentro del subgénero *Tlaloc*, en el Plioceno Inferior (4 Ma aprox.), se produce la separación de la población Chiapas (*terra typica* de *P. hildebrandi*) del resto de las de su subgénero que están en la misma cuenca (*P. labialis* y *P. candalarius*).

En el Plioceno Superior (2-3 Ma aprox.), y dentro del subgénero *Profundulus*, se produce una politomía con la separación de las poblaciones Manialtepec, Papagayo1, Papagayo2, Colotepec1 (todas ellas *P. punctatus*), Polochic (*P. guatemalensis*), un grupo con las poblaciones Tolimán y Bravo (*P. punctatus*) y otro con las poblaciones del grupo *oaxacae* (Mixteco1, Atoyac3 y Atoyac9), Tehuantepec1, Tehuantepec2, Chacalapa, Grijalva y Novillero.

En el Cuaternario (Pleistoceno-Holoceno), y dentro del subgénero *Profundulus* se separan las poblaciones Tehuantepec1, Novillero y Grijalva por un lado (Pleistoceno Inferior), Tehuantepec2 y Chacalapa por otro (Pleistoceno Superior-Holoceno), y el grupo *oaxacae* con las poblaciones Mixteco1, Atoyac3 y Atoyac9, por otro (Pleistoceno Superior-Holoceno).

En este mismo período dentro del subgénero *Tlaloc* se produce la separación de la población de *P. candalarius* (Nentón) de las de *P. labialis* (Ines y Vergel) (Pleistoceno Superior-Holoceno).

4.9 Biogeografía

En los resultados del programa DIVA (Anexo 9), donde se han definido 12 áreas, una por cuenca hidrográfica, se han obtenido 70 alternativas para las reconstrucciones óptimas, y además se requieren 9 dispersiones.

El test de Mantel mostró que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas para las especies y grupos de poblaciones estudiados. Esto se hace evidente para muestras de la misma cuenca hidrográfica como es el caso de las de la cuenca del Atoyac, las cuales presentan una elevada distancia genética entre ellas. Se ha calculado la correlación de las distancias geográficas con las genéticas de los diferentes grupos de poblaciones de las que se sospecha que puedan constituir taxones bien diferenciados, por las evidencias de los resultados encontrados, tal y como se comenta en el apartado de discusión: grupo *balsanus* ($n = 9$; $r = 0,398$; $p = 0,979$); *P. labialis* ($n = 4$; $r = 0,250$; $p = 0,681$); *P. labialis* sin Virgen ($n = 3$; $r = -0,766$); grupo *mixteco* ($n = 6$; $r = 0,256$; $p = 0,785$); grupo *oaxacae* ($n = 3$; $r = 0,496$); *P. punctatus* ($n = 25$; $r = -0,078$; $p = 0,208$); *P. punctatus* sin los grupos *balsanus*, *mixteco* y *oaxacae* ($n = 7$; $r = -0,106$; $p = 0,336$).

Tiempo geológico	Evento cladogenético
Mioceno Inferior (22-23 Ma.)	Separación de los subgéneros <i>Profundulus</i> y <i>Tlaloc</i>
Plioceno Inferior (5 Ma.)	Separación del grupo <i>mixteco</i> dentro del subgénero <i>Profundulus</i>
Plioceno Inferior (4 Ma.)	Separación de <i>P. hildebrandi</i> del resto de las especies del subgénero <i>Tlaloc</i>
Plioceno Superior (2-3 Ma.)	Politomía del resto de poblaciones de <i>P. punctatus</i> y <i>P. guatemalensis</i> dentro del subgénero <i>Profundulus</i>
Pleistoceno-Holoceno	Separación del grupo <i>oaxacae</i> dentro del subgénero <i>Profundulus</i> , y de <i>P. candaliarius</i> y <i>P. labialis</i> dentro del subgénero <i>Tlaloc</i>

Tabla 12: Relación de eventos cladogenéticos en su tiempo geológico, tal y como aparece en el texto.

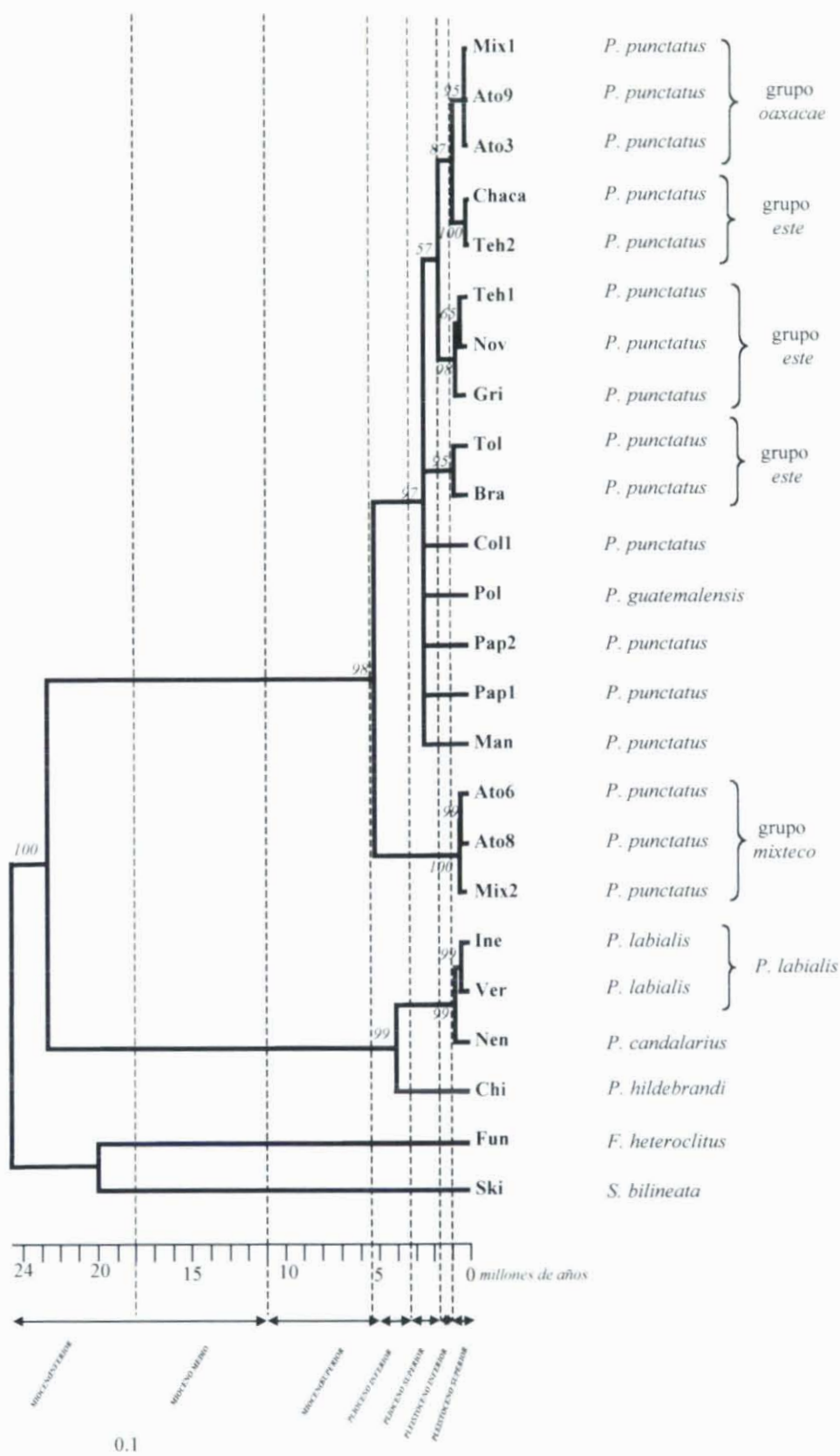


Figura 12: Topología obtenida con un reloj forzado y el método de máxima verosimilitud, siguiendo la clasificación de Miller (1955). Los valores de *bootstraps* en los nodos.

5. Discusión

5.1. Aproximación microevolutiva

5.1.1. La variabilidad genética nuclear

En los resultados que se han obtenido en este estudio, el número medio de alelos por locus varía en el rango 1,1 y 1,9 (con una media de 1,34). Estos valores son similares a los obtenidos en otros ciprinodontiformes como *Brachyrhaphis rhabdophora*, con valores medios de 1,46 (Johnson, 2001). En la familia Cyprinodontidae se han encontrado valores entre 1,1 y 1,7 (Doadrio *et al.*, 1996) y 1,3 para poblaciones de *Gambusia hubbsi* de la Isla Andros (Bahamas) (Schug *et al.*, 1998).

En familias pertenecientes a otros órdenes se han encontrado resultados similares, así para la familia Cyprinidae se han obtenido valores comprendidos entre 1 y 1,5 (Avisé, 1977). En las poblaciones del género *Leuciscus* de Grecia se han hallado una media de 1,3 alelos por locus (Doadrio y Carmona, 1998). En poblaciones de *Rhamdia* los valores oscilaron entre 1,1 y 2,1, con una media de 1,5 (Alcaide, 1998). Para la familia Centrarchidae el mismo autor menciona el rango 1-1,78.

Se ha de tener en cuenta que el número de alelos por locus suele variar considerablemente con el tamaño de las muestras, subvalorándose en las poblaciones pequeñas y sobrevalorándose en las grandes, por lo que la consideración de que el número medio de alelos encontrado se sitúa dentro de los valores medios mencionados en la literatura para peces, ha de tomarse con precaución, ya que, en este estudio, existe una correlación positiva entre el número de alelos por locus y el tamaño de la población ($r=0,436282$, $p=0,009895$) para un nivel de significación del 99%.

Por otro lado, en el análisis genotípico a un nivel superior, en el que se incluyen todas las poblaciones bajo estudio, el 15,3% de todos los loci polimórficos se apartan del equilibrio de Hardy-Weinberg; y en todos estos casos el desequilibrio es debido a un déficit de heterocigotos. Esto puede ser indicativo de subdivisiones de las poblaciones (Alves *et al.*, 1994). Por otra parte, el hecho de que el déficit de heterocigotos pueda estar unido a un desequilibrio de ligamiento no parece ser el caso, ya que según los datos obtenidos en este estudio no hay evidencias para rechazar la hipótesis de independencia entre loci.

En un nivel de población mendeliano, se observa que la población que mostró un mayor número de loci en desequilibrio (el número de loci en desequilibrio aparece entre paréntesis) fue Papagayo1 (4), seguida de Atoyac1 (3) y Novillero (3); todas ellas poblaciones de *Profundulus punctatus*. A continuación Tehuantepec2 (2), Atoyac3 (2), Atoyac5 (2), Colotepec1 (2), Colotepec2 (2), Grijalva (2), Quetzala (2), Tolimán (2), poblaciones de *P. punctatus* y Chiapas (2), población de *P. hildebrandi*, y Jerónimo (2) población de *P. labialis*. Por último con un

locus en desequilibrio Atoyac4, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8, Pichuacan, Bravo y Chacalapa, poblaciones de *P. punctatus*; Comalatengo, población de *P. labialis* y, Grande, población de *P. candalarius*. El déficit de heterocigotos es una consecuencia de diversos factores que se comentarán seguidamente; es difícil llegar a conocer la causa exacta y exclusiva que determina que algunas poblaciones se aparten del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo más probable es que actúen varios factores a la vez y que los loci analizados se vean afectados de distinta manera. Cabe considerar que algunas de las poblaciones más homocigotas, como Papagayo1, se encuentran en el borde de distribución de la especie a la que pertenecen.

El tamaño de la muestra que se analiza es un factor que, en principio, no parece afectar a estos datos, ya que las poblaciones en las que se analizaron un bajo número de individuos (como por ejemplo Tehuantepec1, Manialtepec, Papagayo2, Atoyac2, Mixteco1, Mixteco2, etc) no se han desviado del equilibrio de Hardy-Weinberg. Pero, aunque para la mayoría de las poblaciones se haya analizado un número considerable de individuos, en general mayor que 10, la influencia de este factor no puede descartarse.

Otro de los motivos del desequilibrio puede ser la selección positiva de ciertos loci o genes que se ven favorecidos y seleccionados positivamente, como es el caso de los heterocigotos en mamíferos (Fitch y Atcheley, 1985). En el caso que se trata, los individuos homocigotos serían favorecidos y, por lo tanto, seleccionados a su favor. Esta hipótesis cuestiona la teoría neutral de la mutación que postula que la mayoría de las mutaciones son neutrales y que sobre los genes no actúa la selección natural (Kimura, 1979). Pero esta posibilidad no es válida para la totalidad de los loci analizados, en ninguno de los estudios citados hasta el momento aparecen seleccionados a favor más del 50% de los loci analizados, por lo que sólo puede explicarse que únicamente una parte de los loci lo estén.

Por otro lado, cabe citar los cruzamientos preferenciales en grupos pequeños, que están condicionados porque algunas especies de peces suelen vivir en zonas muy determinadas dentro de los ríos, formando pequeños grupos más o menos aislados entre sí. Este hecho ocurre en gran parte de las poblaciones objeto de este estudio, como se observará más adelante cuando se discuta el flujo genético entre las poblaciones. Así se favorece la endogamia, los intercambios entre ejemplares de la misma población, pudiendo producir un descenso en el número de individuos heterocigotos.

Por último, el factor que pudiera ser el principal motivo de que se hayan encontrado un déficit de heterocigotos es la postura conservadora que se ha tenido a la hora de interpretar los zimogramas. En general, los heterocigotos suelen presentar una mayor dificultad de lectura, y cuando se ha encontrado alguna duda sobre la existencia de un heterocigoto o un determinado genotipo, se ha descartado ese dato para posteriores análisis. En algunos casos, a esto se le puede añadir la imposibilidad de disponer de individuos frescos y el análisis de algunas muestras conservadas congeladas hace cierto tiempo, por lo que podrían haber sufrido cierta degradación, que se traduciría en la menor nitidez de las bandas acentuándose en el caso de los heterocigotos.

En cuanto a la presencia de alelos compartidos por las poblaciones de las vertientes atlántica y pacífica, cabe señalar que todas las poblaciones que pertenecen al subgénero *Tlaloc* tienen tres alelos propios, entre ellos un alelo marcador, y son de la vertiente atlántica. Las poblaciones del subgénero *Profundulus*, que presentan dos alelos propios no fijados, son todas de la vertiente pacífica, excepto Polochic y Grijalva, que son de la atlántica. Esto hace pensar que las cuencas a las que pertenecen estas poblaciones fueron capturadas recientemente por cuencas de la vertiente atlántica.

Al examinar los alelos de las poblaciones agrupadas por cuencas, no se encuentra ningún alelo fijado en las mismas. De las 16 cuencas estudiadas, solamente las poblaciones de 5 de ellas (el 31,25%, y todas ellas con una sola población analizada), presentan alelos propios y en ningún caso fijados. Esto podría ser una consecuencia de la complejidad geomorfológica y de relieve de la zona como consecuencia de la actividad tectónica y sísmica de la misma, se ha de recordar que el área de estudio se sitúa en el sector oriental del llamado “Cinturón de Fuego” del Océano Pacífico. Esta situación, junto a los diferentes factores que modelan el paisaje ha debido producir conexiones y desconexiones entre las distintas cuencas hasta que se han establecido tal y como se conocen hoy día.

De las especies del subgénero *Tlaloc*, las poblaciones de *P. candalarius*, Grande y Nentón, poseen un alelo propio *CK-105** que, no llegando a estar fijado, aparece con una frecuencia elevada (1 en Grande y 0,864 en Nentón). Las cuatro poblaciones de *P. labialis* no presentan ningún alelo propio compartido, eso sí, Jerónimo (*terra typica* de *P. labialis*), Selegua y Comalatengo presentan un alelo fijado compartido, y la población restante Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*), comparte un alelo fijado y seis exclusivos con Chiapas (próximo a *terra typica* de *P. hildebrandi*). Hay que subrayar que la población Selegua (en principio *P. labialis*) presenta varios alelos propios, entre ellos uno fijado, lo que puede ser un indicio para considerarla una especie diferente.

De las especies que pertenecen al subgénero *Punctatus*, las poblaciones de la especie reconocida por Miller (1955) como *P. guatemalensis* presentan un alelo marcador, aunque Guacalate, la población de la *terra typica*, presenta un alelo fijado y dos exclusivos. La presencia del alelo fijado en Guacalate indica una ruptura de flujo génico con la otra población de la especie, Polochic, y se puede pensar en un proceso de especiación. Es muy importante señalar que todas las poblaciones que presuntamente pertenecen a la especie *P. punctatus* no comparten ningún alelo propio. Este hecho, junto a la elevada variabilidad genética que presentan estas poblaciones, hace pensar que se trate de distintas especies, en contradicción a lo publicado por Miller (1955), ya que según él todas estas poblaciones estarían en el área de distribución de *P. punctatus*. Dentro de este conjunto de poblaciones, cabe resaltar la presencia de un alelo fijado en las poblaciones del grupo *oaxacae*. Las poblaciones del grupo *mixteco* también poseen un alelo propio fijado, además de otro exclusivo. El resto de las poblaciones no poseen alelos propios, aunque sí que comparten numerosos alelos.

Analizando las poblaciones por separado, cabe señalar que son varias las que tienen alelos propios, aunque la mayor parte con una baja frecuencia. Entre las que tienen alelos exclusivos

con frecuencia alta destacan: Tehuantepec2, Atoyac4 y Chiapas. Las únicas poblaciones que presentan alelos propios y fijados son Tehuantepec2 y Guacalate. La presencia de estos alelos fijados en estas poblaciones puede ser un indicio para considerarlas especies diferentes. La población de la *terra typica* de *P. scapularis*, (Bravo) sólo presenta un alelo raro y la de la *terra typica* de *P. balsanus* (Papagayo1) presenta un alelo exclusivo. Como se vió en la introducción, estas dos especies fueron consideradas sinónimas de *P. punctatus* por Miller (1995).

En definitiva, casi todas las especies muestran alelos únicos. Esto podría explicarse por varias razones, ninguna excluyente entre sí. Se puede suponer que en la población ancestral de la que divergerían estas especies existían alelos predominantes que estaban en altas frecuencias, y que existía un cierto polimorfismo ancestral debido a lo cual también existían alelos raros. La excisión de la población ancestral en varias subpoblaciones posiblemente conllevara una diferenciación de estas subpoblaciones dando lugar a una distribución no homogénea de los alelos raros, aunque los alelos más comunes deberían aparecer en la mayoría de ellas. Dependiendo del tiempo de divergencia entre las poblaciones, la presencia de alelos raros se ha podido transformar en alelos diagnósticos (con altas frecuencias) (Slatkin, 1985). Los alelos raros (Wright, 1931) han podido extenderse en la población aumentando su frecuencia (Leberg, 1992) debido al establecimiento de poblaciones a partir de un número bajo de individuos en los que la posibilidad de deriva génica por su pequeño tamaño ha podido favorecer a dichos alelos. También podría considerarse que la selección de las mutaciones genéticas no hubiera sido neutral. Así pues, ciertos alelos que proporcionaran alguna adaptación a las condiciones locales podrían haberse visto favorecidos por la selección natural (Slatkin, 1985). Así que, la ausencia de alelos únicos diagnósticos en el conjunto de poblaciones de la especie *P. punctatus*, con una elevada variabilidad fenotípica según Miller (1955), podría explicarse si este grupo de poblaciones se tratara realmente de un grupo de poblaciones de especies distintas.

Como se ha visto en resultados, el porcentaje de loci polimórficos teniendo en cuenta el criterio del 95% recomendado por Nei (1987) para tamaños muestrales inferiores a 50 individuos, oscila entre 9,5% y 61,9 % (con una media de 25,2%). En la literatura, los datos aportados no siempre especifican el criterio utilizado, aunque parece ser que el más frecuentemente usado es el del 95%. Así, los datos que se han obtenido en este estudio exceden a los citados para gran parte de los osteictios, entre 12%-15%, según Nevo (1978), o del 17% citado según Kirpichnikov y Muske (1980). Ayala (1976) ha estimado un valor más elevado para peces, el 31 %. Para géneros pertenecientes al orden ciprinodontiformes, se puede citar el polimorfismo encontrado para *Cyprinodon*, 4%-29% (Villwock, 1982 y Echelle *et al.*, 1987), en el rango encontrado en el género *Profundulus*. Para poblaciones no híbridas del género *Xiphophorus*, se observó un polimorfismo de 14,3% (Morizot y Siciliano, 1982).

Comparando con otros ciprinodontiformes, y teniendo en cuenta que los valores de polimorfismo calculados para las especies de *Profundulus* propuestas por Miller (1955) oscilan entre 14,3%-33,35%, se puede afirmar estos valores están próximos a los encontrados por otros autores, aunque para poblaciones de *Fundulus heteroclitus* se ha obtenido un porcentaje de loci polimórficos mayor del 50% (Mitton y Hoehn, 1975; Powers *et al.*, 1986). Para *Aphanius iberus* se han encontrado unos valores que oscilan entre 12,5%-54,2% (Doadrio *et al.*, 1996) y entre 4,3% y 30,4% (Perdices *et al.*, 2001). Para la misma especie y bajo el criterio del 99%, se ha

Discusión

encontrado valores de 9,5% (García-Marín *et al.*, 1990) y de 7,1% (Scholl *et al.*, 1978). En poblaciones de *A. dispar*, se ha hallado un polimorfismo de 17,8% (Nevo *et al.*, 1984). Para *Cyprinodon macularius*, se han obtenido valores comprendidos entre 10% y 18% (Turner, 1983). Para *Valencia hispanica* se ha encontrado un polimorfismo comprendido entre 32% y 48%, y para *V. letourneuxi* el 16% (Perdices *et al.*, 1996). En poblaciones de *Brachyrhaphis rhabdophora* se ha obtenido una proporción media de loci polimórficos de 36%, en un rango que, entre poblaciones, osciló entre 18 y 72% (Johnson, 2001). En *Gambusia holbrooki* se ha hallado de 37 a 55% loci polimórficos (Hernández-Martich y Smith, 1990). En poblaciones de otra especie de este mismo género, *G. hubbsi*, se ha encontrado una proporción de loci polimórficos de 17,1% (Schug *et al.*, 1998). Para especies del género *Poeciliopsis* se han obtenido diferentes valores de polimorfismo medio: $15\pm 6,3\%$ para *P. monacha* (Vrijenhoek, 1979), 10,7% (0,8%-20%) para *P. occidentalis* (criterio del 99%) (Vrijenhoek *et al.*, 1977), para poblaciones hibridogénicas de *P. occidentalis* y *P. monacha* (Vrijenhoek *et al.*, 1977).

En géneros de otros órdenes como cipriniformes se han encontrado valores de 22% para *Cobitis* (Fernández, 1997), valores de $12\pm 7\%$ para *Barbus* (Machordom, 1992) y valores comprendidos entre 3,4 % y 37,9% en poblaciones del género *Leuciscus* de Grecia (Doadrio y Carmona, 1998). Para la familia Cyprinidae, los valores oscilan entre 0% y 41% (Avise, 1977). En el orden characiformes, se han encontrado valores de polimorfismo medio de 31,9% y 21,5% en *Astyanax* de diferentes nichos (de superficie y de cuevas, respectivamente) (Avise y Selander, 1972) y valores que oscilan entre 5% y 57% para varias especies del género *Leporinus* (Renno, 1989). En perciformes se han encontrado valores entre 9% y 18% para distintas poblaciones de *Dicentrarchus labrax* (Benharrat *et al.*, 1983) y valores entre 0% y 8% en poblaciones del cíclido *Oreochromis niloticus* (Agnèse *et al.*, 1997).

Los valores obtenidos para las heterocigosis observadas en las poblaciones de *Profundulus* oscilan entre 0 y 0,119 (con una media de 0,041). Dentro de los vertebrados los valores de heterocigosis medios están comprendidos entre 0,031 en aves y 0,105 en anfibios. Los peces muestran un valor intermedio. Este parámetro variaría considerablemente según Buth (1984) que propone un valor medio para peces de $0,078\pm 0,012$, pudiendo incluso cambiar para una especie según el hábitat en el que se desarrolle. Para diferentes grupos de peces se han mostrado otros valores: $0,058\pm 0,006$ (Powell, 1975); $0,051\pm 0,033$ (Nevo, 1978); y 0,054 (Avise y Aquadro, 1982). Powell (1975) encontró niveles similares de heterocigoidad entre 14 especies de peces de agua dulce ($0,068\pm 0,03$) y 22 especies de peces marinos ($0,053\pm 0,039$). Por otro lado, para teleósteos marinos se ha estimado un valor de $0,055\pm 0,036$ (Smith y Fuijo, 1982). Además, se ha hallado una heterocigosis media de 0,05 para 195 especies de peces en los que se estudiaron una media de 25,7 loci (Nevo *et al.*, 1984). Nevo (1978) encontró valores similares en especies eurihalinas y euriotérmica de Cyprinodontidae (0,049-0,180). Avise (1977) indica una heterocigosis media de 0,052 para 69 ciprinidos con un rango que oscila según las especies, desde una heterocigosis nula a 0,154.

En poblaciones de *Gambusia holbrooki* se ha encontrado una heterocigosis media de 0,113 (Wooten *et al.*, 1988) y una heterocigosis comprendida entre 0,087 y 0,160 (Hernández-Martich y Smith, 1990). En poblaciones de *G. hubbsi* la heterocigosis media es de 0,025 en un rango de (0,00-0,06) (Schug *et al.*, 1998). En *G. affinis* se han hallado valores de

0,055 (Wooten *et al.*, 1988). En *Poeciliposis monacha* se ha estimado un valor medio de 0,0473 (0,0165-0,0854) (Vrijenhoek, 1979). En *P. occidentalis* se ha estimado una heterocigosidad media de 0,018 (0-0,071) (Vrijenhoek *et al.*, 1977). En poblaciones híbridogenéticas de *P. occidentalis* y *P. monacha* de 0,425 (0,414-0,44), un valor muy elevado ya que incorpora la variación de las dos especies (Vrijenhoek *et al.*, 1977). Para el género *Cyprinodon*, se ha encontrado una heterocigosidad de 0,012-0,123 (Villwock, 1982). Echelle y Echelle (1993) han hallado una heterocigosidad de 0,14, la más elevada de todas las de *Cyprinodon* mencionadas por la literatura, incluyendo la de una población de *C. pecosensis* (0,12) que ha sufrido una introgresión de *C. variegatus* (Echelle *et al.* 1987). En *C. eximius* se ha hallado una heterocigosidad de 0 (Echelle y Echelle, 1998) y en *C. ceciliae* de 0,091 (Echelle y Echelle, 1998). Para poblaciones atlánticas y mediterráneas de *Aphanius iberus* se han encontrado valores que oscilan entre 0 y 0,085 (Perdices *et al.*, 2001), valores comprendidos entre 0,015-0,097 (Doadrio *et al.*, 1996) y de 0,029 (García-Marín *et al.*, 1990). Perdices *et al.* (2001) señalan que los *Aphanius iberus* muestran un nivel más bajo de heterocigosidad genética que la heterocigosidad media mencionada por Ward *et al.* (1994) para peces de agua dulce (0,062). En poblaciones de *A. dispar* se ha hallado una heterocigosidad de 0,049 (Nevo *et al.*, 1984). Por otro lado, se ha encontrado una heterocigosidad comprendida en el rango 0,063-0,122 en *Valencia hispanica* y de 0,029 en *Valencia letourneuxi* (Perdices *et al.*, 1996). Johnson (2001) encontró un valor de 0,13 para todas las poblaciones de *Brachyrhaphis rhabdophora*, en un estudio sobre la organización jerárquica de la variación genética en poblaciones de esta especie.

Para otros géneros y especies menos emparentados con *Profundulus* como *Rhamdia parry* se ha hallado un valor de 0,12 y 0,07 para *R. reddelli* (Alcaide, 1998). En poblaciones del género *Cobitis* de la Península Ibérica y de África se ha observado una heterocigosidad media de 0,035 (0,005-0,073) (Perdices *et al.*, 1995). En el género *Salmo* se ha hallado una heterocigosidad comprendida entre 0,048-0,074 (Wishard *et al.*, 1984). En poblaciones de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, se ha observado una heterocigosidad comprendida entre 0 y 0,045 (Agnèse *et al.*, 1997). En poblaciones de *Salmo trutta* se ha hallado una heterocigosidad comprendida entre 0,0224 y 0,0355 (Togan *et al.*, 1995). Por otro lado, Avise y Selander (1972) hallaron una heterocigosidad media de 0,112 y 0,032 en *Astyanax* de diferentes nichos (de superficie y de cuevas, respectivamente), y atribuyeron esta diferencia a la deriva genética.

En cuanto a las comparaciones realizadas anteriormente sobre polimorfismo y heterocigosidad, cabe señalar que se han de interpretar con precaución ya que realmente sólo serían válidas cuando el número y el tipo de loci utilizados y las técnicas empleadas han sido las mismas (Buth *et al.*, 1991; Togan *et al.*, 1995). Los valores de la literatura son solamente orientativos ya que muchas veces se utilizan diferentes bases de datos, sistemas enzimáticos, coloraciones, etc. Además, los valores de polimorfismo y heterocigosidad de las poblaciones dependen del tipo y del número de loci empleados en él. Se puede concluir que la heterocigosidad observada para las especies de *Profundulus* es media-alta, aunque en términos generales, se encuentra entre los valores citados en la literatura para peces; con poblaciones como Atoyac8 que presentan un valor muy elevado, y otras como Atoyac4, Polochic y Grijalva que no presentan polimorfismo alguno. Existen estudios en los que se interpreta que los bajos niveles de heterocigosidad deben estar relacionados con la pérdida de variación genética debido a

un descenso drástico en el número de individuos causando un cuello de botella (Bonnell y Selander, 1974). Esto sería debido a que se asume que los valores de heterocigosis reflejan la totalidad de la variabilidad genética y es por ello por lo que en ciertas ocasiones se utilizan como base para el manejo y gestión de las especies (Vrijenhoek *et al.*, 1985; Leberg, 1990). No obstante, ciertos trabajos apuntan a pensar que las disminuciones drásticas en el tamaño de la población afectarían más a la diversidad alélica, es decir, al polimorfismo y número medio de alelos por locus más que a la heterocigosis (Leberg, 1992). Cuando más tiempo permanezca la población con un número pequeño de individuos mayor pérdida de variación genética (Leberg, 1992).

La heterocigosis media es el parámetro al que se le suele conferir mayor importancia y al que se le ha relacionado en la literatura científica con un número de fenómenos de distinta índole. Diversos autores, entre ellos Nevo (1978), han relacionado los valores de polimorfismo y heterocigosis en diferentes especies de plantas, invertebrados y vertebrados con los nichos que ocupan, y proponen varias generalizaciones, como que las especies generalistas presentan una heterocigosis mayor que las especialistas. Estas diferencias en la variabilidad genética encontrada en diferentes poblaciones dependiendo del nicho ecológico no se ha encontrado en las poblaciones estudiadas. Así, en el caso de los peces, las especialistas habitarían las zonas altas de los ríos, de corriente rápida y ricas en oxígeno, mientras que las generalistas ocuparían un hábitat más heterogéneo, pudiendo vivir en cursos altos y bajos. En este estudio, no se han encontrado diferencias significativas en los parámetros de variabilidad entre los peces que habitan pequeños ojos de agua, lagos y ríos, y es que para establecer una relación entre la heterocigosis y el nicho es necesario conocer los acontecimientos pasados de la dinámica de las poblaciones bajo estudio, como posibles cuellos de botellas o el momento en el que se fundó la población, así como su tamaño. Interpretaciones de las heterocigosidades que se realicen sin tener en cuenta estos acontecimientos deben ser tomadas con cautela (Soulé, 1980).

Con otro parámetro con el que se ha relacionado la heterocigosidad ha sido el tamaño de la población y según la teoría neutralista, ambos parámetros están correlacionados (Kimura y Ohta, 1971), con lo que bajos niveles de heterocigosis pueden ser debidos más a un pequeño tamaño de población que a una estrategia adaptativa. Existen modelos como los desarrollados por Watterson (1984) que indican como evoluciona la heterocigosis después de fenómenos de cambios drásticos en el tamaño de la población, como los cuellos de botella (Nei *et al.*, 1975; Chakraborty y Nei, 1977; Motro y Thomson, 1982). Aunque en este estudio no se da correlación alguna entre el tamaño medio de la muestra y la heterocigosis observada ($r=0,278063$, $p=0,11316$) ni entre el tamaño medio de la muestra y el porcentaje de loci polimórficos ($r=0,311642$, $p=0,072784$).

Por otra parte, son de importante consideración los comentarios de otros autores (Shaw *et al.*, 1994; Nevo, 1988) quienes han señalado un descenso de los parámetros de variabilidad en las poblaciones situadas en los bordes de las áreas de distribución de las especies, descenso que puede observarse en este estudio en algunas poblaciones como es el caso de Papagayo1, Papagayo2, etc.

Se ha relacionado también la heterocigosis con la velocidad de desarrollo. Danzmann *et al.* (1985) proponen que una mayor velocidad en el desarrollo de los heterocigotos puede ser el resultado de las propiedades bioquímicas de enzimas producidas por distintos genes, lo que implica una menor probabilidad de accidentes en los periodos críticos. Además, los loci enzimáticos puedan ser marcadores de segmentos cromosómicos que influyen en la velocidad de desarrollo. Por otra parte, Mitton (1978) y Leary *et al.* (1983), comprueban la hipótesis de homeóstasis genética de Lerner (1954), encontrando que una mayor en *Salmo gairdneri*, lo mismo encontró para *Fundulus heteroclitus*. Sin embargo, Beacham heterocigosis provoca una mayor estabilidad en el desarrollo al estudiar la proporción de caracteres asimétricos y Withler (1985) no encuentran tal relación en el análisis de caracteres merísticos, morfométricos y genéticos de los salmónidos *Onchorhynchus gorbuscha* y *Onchorhynchus keta*.

Por otra parte, Fuerst *et al.* (1977) y Chakraborty y Yokoyama (1978) buscan el modelo de evolución que mejor se ajuste al mantenimiento de un cierto nivel de polimorfismo, y ambos concluyen que, aunque sus predicciones se ajustan a las hipótesis de “mutación-deriva” o “mutación-neutra”, otras hipótesis no pueden ser totalmente rechazadas (Machordom, 1992).

Ante todas estas consideraciones, más o menos teóricas y en ciertos casos contradictorias, debe pues tratarse con prudencia toda conclusión que se pueda extraer sobre comparaciones de tasas de heterocigosis (Machordom, 1992).

Los resultados electroforéticos obtenidos son comparables para todas las especies ya que han sido utilizadas las mismas técnicas y los mismos sistemas enzimáticos obteniéndose el mismo número de loci. De todos modos, los resultados habría que tomarlos con precaución porque el número de poblaciones analizadas en cada subgénero y en cada especie es variable. Así, al agrupar las poblaciones por especies según sugiere Miller (1955) no aparecen diferencias significativas entre los parámetros de variabilidad genética. En cambio estas diferencias sí son significativas entre los tres parámetros de variabilidad genética cuando se comparan los dos subgéneros, siendo bastante más elevados en caso del subgénero *Tlaloc*. En principio, se podría pensar en una mayor diversidad y variabilidad genética entre las poblaciones del subgénero *Profundulus* por dos motivos principales; uno es porque se ha estudiado un mayor número de poblaciones de este subgénero, y el otro porque la distribución de este grupo de poblaciones ocupa un mayor área geográfica. La distribución de los subgéneros hace pensar en una colonización en la que *Profundulus* fuera el subgénero ancestral y *Tlaloc* el derivado. Pero los datos de variabilidad genética que se han obtenido en este trabajo, sugieren un camino inverso de colonización, ya que los grupos ancestrales tienen más variabilidad genética que los derivados.

5.1.2. La variabilidad genética mitocondrial

Son pocos los estudios que aparecen en la bibliografía en los que se empleen las secuencias de los genes que codifican para las ATPasas 6 y 8 y que aborden cuestiones similares a las que se abordan en este estudio. Sivasundar *et al.* (2001) han estudiado la estructura de las poblaciones y la biogeografía de *Prochilodus*, un pez sudamericano migratorio de agua dulce. En este

estudio, los autores encuentran unas frecuencias de bases nucleotídicas (A=0,282; C=0,315; G=0,118 y T=0,285) similares a las encontradas para *Profundulus* (A=0,295; C=0,271; G=0,115 y T=0,318) con una desviación en la proporción de nucleótidos consistente en una proporción menor de las guaninas, lo que suele suceder en peces (Meyer, 1993; Durand *et al.*, 1999).

En el estudio de Sivasundar *et al.* (2001), las secuencias se ajustan al mismo modelo al que se ajustan las secuencias de *Profundulus*, el modelo HKY85+G, siendo su valor de *gamma* (0,266) inferior al hallado para *Profundulus* (0,4343). En cuanto a la relación Ts/Tv, el valor hallado para *Prochilodus* (10,985) superó al encontrado para *Profundulus* (3,318).

En las secuencias estudiadas en el presente trabajo hay una ligera señal de saturación de las terceras posiciones, lo mismo que encuentran Perdices y Doadrio (2001) estudiando los cobítidos europeos mediante los genes que codifican para la ATPasa 6 y 8, y citocromo b.

Las longitudes totales de los genes de ATPasa son comparables a los citados para otros vertebrados. Para *Profundulus*, el codón de terminación de la ATPasa 8 se encuentra en la posición 166-168, Machordom y Doadrio (2001) estudiando la filogeografía de *Luciobarbus* lo encuentran en la posición 163-165, mientras que el codón de inicio ATG para ATPasa 6, lo encuentran en el nucleótido 159.

5.1.3. Resolviendo las hipótesis de variabilidad

En estudios llevados a cabo en los peces del género *Clupea*, se indicó que un aumento en la heterocigosis podría relacionarse con una varianza morfológica reducida (King, 1985). En cambio se ha encontrado una variabilidad genética media-alta en todas las especies del género *Profundulus*. Miller (1955) señala que tres de las especies estudiadas, *P. punctatus*, *P. guatemalensis* y *P. labialis*, muestran una variación intraespecífica considerable en cuanto a caracteres morfológicos se refiere y que esta plasticidad fenotípica podría ser una respuesta a variaciones medioambientales. Esto entraría en contradicción con lo observado por King (1985).

En lo que a la especie *P. punctatus* se refiere, esta elevada variabilidad puede ser consecuencia de que el conjunto de poblaciones que, en principio, se estudian como pertenecientes a esta especie, sean poblaciones de especies diferentes.

5.1.4. El flujo genético

En cuanto a la estructuración de las poblaciones se puede decir que, dados los elevados valores de flujo genético para el conjunto de poblaciones ($F_{st}=0,838$, $F_{it}=0,914$ y $F_{is}=0,469$), éste se encuentra subdividido en grupos, con un escaso flujo genético y una elevada endogamia que sería una de las causas del déficit de heterocigotos. Estos resultados eran esperables ya que se ha incluido en este análisis poblaciones de los dos subgéneros y de diferentes especies. Se observa además que el mayor porcentaje de variación se debe a la diferencia entre poblaciones

(el 82,7%). Casi todos los loci parecen presentar una medida comparable de F_{st} , lo que puede indicar que la causa principal de la diferenciación genética sea la deriva genética, sin que parezca existir una selección direccional. Pero es precipitado obtener estas conclusiones, ya que algunos estudios teóricos y prácticos han demostrado que la dinámica de poblaciones puede tener una influencia significativa en la F_{st} y pueden complicar una interpretación tan simple como la realizada anteriormente, donde entran a formar parte únicamente la deriva genética y el flujo genético. Eventos de extinción periódica y recolonización pueden producir diferentes frecuencias alélicas frente a un elevado flujo génico. Los cuellos de botella son también particularmente efectivos en amplificar las F_{st} ya que, en principio, a la población fundadora no se la puede reconocer como panmíctica. Además, Gaggiotti (1996) también demostró teóricamente que la estructura genética local puede estar muy influenciada por migraciones estocásticas entre poblaciones.

El elevado valor de F_{st} de las poblaciones del Atlántico y de las del Pacífico, valor que indica una interrupción del flujo génico, es totalmente esperable, ya que ambos grupos de poblaciones constan de varias especies, cuatro al menos en la atlántica y dos en la pacífica. Esta distribución es la causa también de que el coeficiente de endogamia de las del Pacífico sea mayor que las del Atlántico.

Observando los valores de F_{st} por cuencas, se observan también valores significativos bastante elevados, salvo el caso de la cuenca del Colotepec en la que hay dos poblaciones de la misma especie. La cuenca del Papagayo, que consta de dos poblaciones de la misma especie, tiene un valor de F_{st} más elevado que la del Colotepec, al parecer ha disminuido el flujo génico entre ambas, por lo que se sospecha que puedan tratarse de especies distintas. La cuenca del Grijalva-Usumacinta también tiene un valor elevado y significativo, que se justifica porque la habitan poblaciones pertenecientes a *P. punctatus*, *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*, por lo que se supone que no hay flujo génico alguno. Sin embargo, cabe subrayar la situación de las cuencas del Atoyac-Verde, Mixteco y Tehuantepec que poseen unas F_{st} muy elevadas y significativas, estando exclusivamente habitadas, en principio, por poblaciones de la especie *P. punctatus*. En estas últimas cuencas la variación de la F_{st} se debe principalmente a la variación que se da entre las poblaciones, más que a la producida dentro de las poblaciones.

Por grupos de poblaciones dentro de cada especie, los resultados muestran unos valores de F_{st} bajos en *P. candalarius*, y más elevados en *P. punctatus*, *P. guatemalensis* y *P. labialis*. Las poblaciones que pertenecen a *P. punctatus* y a *P. guatemalensis*, poseen una F_{st} elevadísima lo que indica que, en principio, estas dos especies englobarían poblaciones que pudieran comportarse de un modo independiente y/o especies distintas. El caso de *P. guatemalensis* se podría explicar porque se trata de dos poblaciones que se encuentran en vertientes diferentes, por lo que se ha producido un aislamiento reproductivo. Respecto a *P. labialis*, y si se extrae la población Virgen que genéticamente parece más próxima a *P. hildebrandi*, la F_{st} disminuye de 0,671 a 0,421. En cuanto a *P. punctatus*, existen indicios para pensar que agrupa poblaciones de varias especies.

Los elevados valores de F_{st} encontrados en *P. punctatus* (0,756), *P. guatemalensis* (0,756) y *P. labialis* (0,671), superan a los encontrados: entre especies bien establecidas del género *Cyprinodon* (0,014-0,19) (Echelle *et al.*, 1987), entre poblaciones de *Valencia hispanica* y *V. letourneuxi* (0,625) (Perdices *et al.*, 1996) y) entre poblaciones de *Cobitis maroccana* y *C. paludica* (0,627) (Perdices *et al.*, 1995).

La diferenciación genética indica un reducido flujo génico lo que permite a las poblaciones adaptarse a las condiciones ambientales locales (Kato y Foltz, 1994). Esta elevada interrupción de flujo genético refleja una discontinuidad genética. Los dos grupos de poblaciones de *P. punctatus* que comparten alelos diagnósticos tienen una F_{st} de 0,408 (grupo *mixteco*) y 0,315 (grupo *oaxaca*); y las poblaciones de Chiapas y Virgen, una F_{st} de 0,414.

Los elevados valores de F_{st} de *P. punctatus*, junto a otros indicios de los que se dispone hasta el momento, hacen pensar en un grupo de poblaciones de diferentes especies.

La estructuración de las poblaciones que pertenecen a *P. punctatus*, *P. guatemalensis*, *P. labialis* y *P. candalarius* se debe en mayor medida a la interrupción del flujo génico que a la endogamia. En cambio en los dos grupos de poblaciones de la región Mixteca que comparten alelos diagnósticos, la estructuración de las poblaciones se debe a la existencia de cruzamientos entre individuos, lo que indica una subdivisión dentro de las poblaciones y de cruzamientos dirigidos no producidos al azar.

5.1.5. Las distancias genéticas

En cuanto a las distancias genéticas, cabe comentar que la media de las distancias entre las poblaciones de la vertiente atlántica y pacífica ($D_{CS}=0,704$; $D_{Nei}=1,130$) es muy similar a la distancia que separa los dos subgéneros ($D_{CS}=0,764$; $D_{Nei}=1,337$), algo lógico pues todas las poblaciones del subgénero *Tlaloc* pertenecen a la vertiente atlántica, y todas las del subgénero *Profundulus*, excepto Grijalva y Polochic, pertenecen a la pacífica. Esta distancia entre las poblaciones de las distintas vertientes es bastante superior a $D_{Nei}=0,089$ encontrada en poblaciones de especies de *Rhamdia* de México y Guatemala (Alcaide, 1998).

Las distancias genéticas de Nei a nivel poblacional en peces tienen un rango amplio, oscilando entre 0 y 0,063 (Machordom *et al.* 1999), siendo de las mayores (0,002-0,254) las encontradas entre distintas poblaciones de *Aphanius iberus* (Doadrio *et al.*, 1996), posteriormente descritas como diferentes especies (Perdices *et al.* 2001). Por lo general, distancias de Nei superiores a 0,2 son lo más frecuente entre especies próximas (congenéricas) y distancias de Nei inferiores a 0,15 entre especies nominales puede hacer dudar de su valía si no se tiene más que esa evidencia de su estatus específico (Thorpe, 1984; Highton, 1990; Schönhuth, 2002).

Estos valores se toman para contrastar los datos que se presentan a continuación. Para comenzar, y desde un punto de vista geográfico, se observa como las poblaciones de la cuenca de Grijalva-Usumacinta guardan entre ellas una media de distancia bastante elevada, algo esperable ya que esta cuenca alberga poblaciones pertenecientes a *P. punctatus*, *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*. En cambio, se resaltan los elevados valores de la media de las distancias entre las poblaciones pertenecientes a las cuencas de Mixteco ($D_{Nei}=0,856$), Atoyac-Verde ($D_{Nei}=0,460$) y Tehuantepec ($D_{Nei}=0,283$), que albergan poblaciones que en principio pertenecen a *P. punctatus*. En cambio, el elevado valor de estas distancias hace pensar que albergan poblaciones de especies diferentes.

En cuanto a la media de las distancias de las poblaciones dentro de cada subgénero es bastante similar, siendo un poco más elevada dentro del subgénero *Profundulus*. Sin embargo la media de las distancias que separan las poblaciones de los dos subgéneros de *Profundulus* es muy elevada ($D_{Nei}=1,337$), bastante mayor que 0,689 y 0,863, el rango del valor de las distancias encontradas entre los géneros *Mugil*, *Liza* y *Valamugil* (Lee *et al.*, 1995). Cabe resaltar que la distancia que separa a los dos subgéneros es bastante superior a $D_{Nei}=0,482$ y $D_{Nei}=0,229$, las distancias que separan a los géneros *Hucho* y *Brachymystax* y *Parasalmo* y *Oncorhynchus*, respectivamente (Osinov y Lebedev, 2000). Para establecer una correcta comparación cabe decir que, para subfamilias, los mismos autores encontraron entre Salmoninae y Thymallinae, y entre Salmoninae y Coregoninae aproximadamente $D_{Nei}=1,4$, mientras que la distancia entre Thymallinae y Coregoninae es sustancialmente más baja $D_{Nei}=0,79$. Para comparar familias del mismo orden, Perdices *et al.* (1996) encontraron unos valores de $D_{Nei}=1,604$ entre *Fundulus heteroclitus macrolepidotus* y *V. hispanica*, y de $D_{Nei}=1,116$ entre *Fundulus heteroclitus macrolepidotus* y *Valencia letourneuxi*. Por otro lado, cabe decir que para estudiar 20 taxones de géneros de la familia Centrarchidae, se ha establecido la división entre géneros en $D_{Nei}=1,340\pm0,064$ (Avice y Smith, 1977) y cabe señalar que el rango de distancias intergenéricas entre ciprínidos de centroeuroa es $0.14 < D_{Nei} < 3.07$, lo cual está en el rango de otras distancias intergenéricas entre ciprínidos (Hänfling y Brandl, 2000). Tras realizar estas comparaciones, se puede considerar proponer elevar el *status* taxonómico de los dos subgéneros que se están estudiando, *Profundulus* y *Tlaloc*, a nivel de género.

Antes de comenzar la discusión acerca de la media de las distancias dentro de las poblaciones que constituyen las especies, cabe señalar que durante el trabajo de campo, se capturó *Profundulus labialis* en simpatria con *P. guatemalensis* y *P. punctatus*, pero en este estudio no se han analizado ninguna de estas poblaciones. Como síntesis de los resultados, se puede decir que la media de las distancias que separan las poblaciones de *P. punctatus* es la más elevada con respecto al resto de las especies ($D_{Nei}=0,347$). Aunque la media de las distancias de las poblaciones del resto de las especies tienen un valor que supera la $D_{Nei}=0,2$ mencionada anteriormente como el límite para diferenciar especies.

Las distancias genéticas encontradas entre diferentes especies de peces presentan un amplio rango de variación, llegando a solaparse para distintas categorías y Pasteur y Pasteur (1980), entre otros, previenen a cerca de la sobrevaloración de los datos de distancia genética en estudios taxonómicos. Sin embargo, estos valores proporcionan una orientación aproximada sobre el grado de divergencia entre los objetos de estudio. Así, el valor obtenido en este estudio

es mayor que: $D_{Nei}=0,237$, la distancia entre dos especies congenericas de *Liza* (Lee *et al.*, 1995); $D_{Nei}=0,23$, la distancia genética más baja encontrada entre dos especies cualesquiera de *Xiphophorus* (Morizot y Siciliano, 1982); $D_{Nei}=0,15$, entre *Aphyosemion scmitti* y *A. geryi* (Romand, 1986); $D_{Nei}=0,28-0,33$, entre *A. scmitti* y *A. liberiense* (Romand, 1986); $D_{Nei}=0,159$, entre especies del género *Galaxias* (Allibone *et al.*, 1996); $D_{Nei}=0,19$ entre *Menidia beryllina-M. peninsulæ*, (Duggins, 1983); $D_{Nei}=0,18$, entre *Menidia colei-M. peninsulæ* (Duggins, 1983); $D_{Nei}=0,037$, entre *Salvelinus alpinus* y *S. malma* (Osinov y Lebedev, 2000); $D_{Nei}=0,045$, entre formas del Atlántico y del Danubio de *Salmo trutta* (Osinov y Lebedev, 2000); $D_{Nei}=0,095$, entre dos formas de *Brachymystax lenok* (Osinov y Lebedev, 2000); $D_{Nei}=0,073$, entre *Thymallus thymallus* y *T. arcticus* (Osinov y Lebedev, 2000); y, $D_{Nei}=0,26$, entre las especies *Abramis brama* y *A. bjoerkna* (Hänfling y Brandl, 2000).

Siendo cautos, el valor obtenido está comprendido en el rango 0,25-0,54, en el cual se incluyen las distancias halladas para especies de *Rhamdia* (Alcaide, 1998). Además el valor que se ha hallado es menor que $D_{Nei}=0,546$, entre *Oncorhynchus masou* y *O. keta* (Osinov y Lebedev, 2000); $D_{Nei}=0,429$, entre *O. masou* y *O. nerka* (Osinov y Lebedev, 2000); $D_{Nei}=0,578$ entre especies del género *Notropis* (Dowling y Brown, 1989); y $D_{Nei}=0,47$, entre especies proximas de *Barbus* de la península Ibérica y de Grecia (Karakousis *et al.*, 1995).

Para especies más emparentadas con las que son objeto de este estudio, se ha encontrado un valor bastante elevado, $D_{Nei}=0,916$, entre las poblaciones de *Valencia hispanica* y *V. letourneuxi* (Perdices *et al.*, 1996). Perdices *et al.* (2001) en un estudio realizado sobre poblaciones atlánticas y mediterráneas de *Aphanius iberus*, hallaron valores medios de $D_{Nei}>0,15$, actualmente consideradas especies diferentes (Doadrio *et al.*, 2002).

Si de las poblaciones de *P. labialis*, se extrae la población Virgen (*terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*), la distancia de Nei desciende a 0,106, por lo que se cuestiona la posición taxonómica de la población Virgen como perteneciente a la especie *P. labialis*. Por otro lado también se ha observado en los resultados como las poblaciones que comparten alelos diagnóstico mantienen unos valores de D_{Nei} bajos, menores de los límites señalados anteriormente para separar especies. Finalmente, las poblaciones Chiapas y Virgen que comparten alelos diagnósticos tienen un valor de $D_{Nei}=0,171$, por lo que existe otra evidencia para sospechar de que se tratan de dos poblaciones de una misma especie.

En cuanto a las distancias entre las especies, las mayores se dan entre las especies de los dos diferentes subgéneros, como es lógico, reduciéndose las mismas entre las de un mismo subgénero. Los resultados obtenidos mediante el test de Mantel tampoco revelan relación alguna con la proximidad geográfica. Aún así, es preciso señalar la elevada distancia que se produce entre *P. hildebrandi*, y *P. candalarius* y *P. labialis*, especialmente entre *P. hildebrandi* y las otras dos especies del subgénero *Tlaloc*; a pesar de que pertenecen a la misma cuenca y se encuentran muy próximas geográficamente.

En cuanto a las diferencias obtenidas a partir de los datos de secuencias se puede decir que, a diferencia de las aloenzimas, aquí no se dispone de muchos datos para comparar, pues son

pocos los estudios de esta naturaleza en los que se han aplicado exclusivamente las secuencias de los genes que codifican para las ATPasas 6 y 8. Así, la divergencia no corregida entre los géneros *Prochilodus* y *Semaprochilodus*, se encuentra entre 12,5 y 16%, (Sivasundar *et al.*, 2001), frente a la media de 22,44% entre los subgéneros *Tlaloc* y *Profundulus*. Por otro lado, *Sabanejewia* difiere de *Cobitis* con una media de 20,8% de divergencia, mientras *Misgurnus* y *Cobitis* difieren con una media de 20,2% (Perdices y Doadrio, 2001).

Entre todas las especies de *Prochilodus* se ha hallado una divergencia no corregida que oscila entre 0 y 5%, frente a 0,8 y 1,48% para *Tlaloc*, y 3,2 y 4,69% para *Profundulus*. Entre las 13 muestras de *Prochilodus lineatus* de la cuenca del Paraná, la divergencia máxima fue de 1,3%. En este estudio se ha encontrado 4,69% para *P. punctatus*, 3,2% para *P. guatemalensis*, 1,48% para *P. labialis* y 0,8% para *P. candalarius*. La divergencia hallada para los dos grupos de poblaciones de *P. punctatus* que comparten alelos diagnósticos es de 0,72% para las poblaciones del grupo *mixteco* y de 0,35% para las poblaciones del grupo *oaxacae*. Por otro lado, las especies del subgénero *Cobitis* mostraron niveles de divergencia que varían de 4,6 a 6,9%. Perdices y Doadrio (2001) encontraron una oscilación entre 0,1 y 1,4% al realizar comparaciones dentro de las divergencias pareadas entre haplotipos dentro de cada especie.

La distancia genética entre peces de la misma especie de Paraná, Amazonas y Orinoco fueron bajas, oscilando entre 0,8% y 2,5%. Para *P. punctatus* de Mixteco, Atoyac-Verde, Papagayo, Tehuantepec y Chacalapa, se han encontrado diferencias que oscilan entre 0,1 y 3,5%.

Por lo general, el citocromo b es quien muestra más divergencia entre especies que las ATPasas, es decir, está menos conservado (Machordom y Doadrio, 2001). En este estudio se ha podido comparar la divergencia basada en las secuencias que codifican para el citocromo b y las que codifican para las ATPasas 6 y 8 de las especies *P. guatemalensis*-*P. punctatus*, siendo los resultados 0,06 y 0,04 respectivamente. Teniendo en cuenta lo anterior y al no disponer en bibliografía de muchos datos sobre distancias calculados a partir de ATPasas 6 y 8, se han comparado los datos de secuencia con los siguientes, obtenidos a partir del citocromo b. En su estudio realizado con barbos, Machordom y Doadrio (2001) encuentran un valor de divergencias medio de 6,10% (5,33% para las ATPasas y 6,67% para el citocromo b). Combinando ambas secuencias, hallaron una divergencia media entre poblaciones de una única especie de 0,36%. Así, la divergencia media entre las especies ibéricas fue alrededor de 3,7% (con un valor mínimo del 1% entre *Barbus comiza* y *B. bocagei*). Además, encontraron una divergencia baja también entre especies del Cáucaso (3,33%). La divergencia entre las dos especies griegas fue de 6,34% y entre los *taxa* del Norte de África de 4,80%.

García *et al.* (2000) estudian las relaciones filogenéticas de 14 especies del género *Cynolebias* basándose en el gen mitocondrial que codifica para el citocromo b. Estimaciones de la divergencia utilizando el modelo Ts+Tv de dos parámetros de Kimura para el citocromo b, oscila entre 4,5% y 25,9%. El grado medio de divergencia de secuencias entre *Cynolebias* y los tres géneros que forman el grupo externo es de 33% (*Austrofundulus*) y 37% (*Trigonectes* y *Leptolebias*). Los altos niveles de divergencia de secuencias intragenéricas (hasta 25,9%) para

el citocromo b en *Cynolebias* son similares a las encontradas en el género *Rivulus* (22.1%-25.6%) entre los endemismos de las Antillas y los *taxa* del continente (Murphy y Collier, 1996). Sin embargo, en los Cyprinodontiformes del género *Fundulus*, la media de la divergencia de secuencias del nucleótido entre especies es 17.2% y entre especies dentro del mismo subgénero 10.3% (Bernardi y Powers, 1995), mientras que se encuentran valores más bajos en el género *Gambusia* (Lydeard *et al.*, 1995). Los rangos de la divergencia de secuencias observados en *Atheriniformes* están por encima de los 17% entre los diferentes géneros de la familia *Melanotaeniidae* (Zhu *et al.*, 1994).

5.2. Aproximación macroevolutiva

Desde un punto de vista geográfico, se observa como en todos los dendrogramas estudiados se agrupan, por un lado, las poblaciones pertenecientes a la cuenca del Grijalva-Usumacinta (que son todas las poblaciones de la vertiente atlántica excepto Polochic, *P. guatemalensis*, y Grijalva, *P. punctatus*), y por otro, las poblaciones pertenecientes a las cuencas de la vertiente pacífica.

Cabe resaltar que las dos poblaciones de la cuenca del río Tehuantepec no se agrupan en los dendrogramas que están mejor resueltos. Lo mismo le sucede a las poblaciones de la cuenca del río Mixteco.

Por otro lado, las poblaciones que pertenecen al grupo *oaxacae* aparecen agrupadas en todos los dendrogramas. Las poblaciones del grupo *mixteco* se agrupan de manera significativa en el dendrograma de distancias elaborado a partir de los datos de secuencias (Figura 5), pero se encuentran en politomía con poblaciones del resto de las cuencas de la vertiente pacífica en el dendrograma de máxima parsimonia elaborado a partir de secuencias (Figura 11).

Las poblaciones del subgénero *Profundulus* y *Tlaloc* están agrupadas en todos los dendrogramas, excepto las de este último que forman una politomía en el dendrograma de máxima verosimilitud elaborado a partir de las secuencias (Figura 7), y en las filogenias elaboradas por el método de máxima parsimonia basándose en los datos aloenzimáticos (Figuras 9 y 10).

Dentro del subgénero *Profundulus*, algunas de sus poblaciones se agrupan en los dendrogramas mejor resueltos. Éste es el caso de las poblaciones del grupo *mixteco* y del grupo *oaxacae* tal y como se vió anteriormente al hablar de poblaciones que pertenecena una misma cuenca. Las poblaciones que forman parte del grupo *balsanus* no se agrupan en ninguno de los dendrogramas. Las poblaciones que forman parte del grupo *este* se agrupan, pero no de manera significativa, en los árboles de distancias elaborados a partir de los datos aloenzimáticos. Por otro lado, Polochic y Guacalate, las poblaciones de *P. guatemalensis*, se agrupan, aunque no de manera significativa, en todos los dendrogramas de distancias de Cavalli-Sforza y de Rogers, pero en el elaborado a partir de los datos de secuencias se encuentran en politomía con otras

poblaciones de *Profundulus*, lo mismo sucede en el filograma de parsimonia elaborado a partir de secuencias.

Dentro del subgénero *Tlaloc* se observa como, en todos dendrogramas de distancias, aparecen agrupadas las poblaciones de Chiapas y Virgen aunque no presentan un elevado valor de *bootstraps*. En el dendrograma de distancias de Cavalli-Sforza se produce un agrupamiento significativo de Selegua, Comalatengo y Jerónimo (*P. labialis*) con Nentón y Grande (*P. candalarius*). En el árbol construido a partir de las distancias de Rogers hay una separación de Grande y Nentón (*P. candalarius*) del resto (Jerónimo, Selegua y Comalatengo, pertenecientes a la especie *P. labialis*). En el árbol obtenido a partir de las distancias de las secuencias, se produce una politomía de todas las poblaciones quedando agrupado Jerónimo y Comalatengo (*P. labialis*). Esto puede ser debido a una reciente separación, tal y como se comentará más adelante cuando se discutan los resultados relacionados con el reloj molecular.

5.3. Resolviendo hipótesis sobre la posición taxonómica y filogenia

En lo que al nivel genérico se refiere, en la introducción de este estudio, al tratar acerca la posición taxonómica del género *Profundulus*, se vió que Parenti (1981) incluyó este género en la familia Profundulidae, de la que es su único representante. Con los datos de los que se dispone, conociendo la distancias genética que separan a los dos subgéneros de *Profundulus* y tras compararlas con las distancias genéticas que aparecen en la literatura científica, además de por elevado número de caracteres morfológicos y morfométricos que tienen, se podría pensar que son dos géneros distintos: *Profundulus* y *Tlaloc*, que se situarían en la familia Profundulidae (Parenti, 1981).

En cuanto a la filogenia del género *Profundulus*, se puede decir que, como resultado de interpretar todos los dendrogramas calculados, existe una congruencia entre los dendrogramas obtenidos utilizando los datos de las frecuencias aloenzimáticas y entre los dendrogramas obtenidos utilizando los datos de las secuencias de los genes que codifican para las ATPasas 6 y 8. De todos los dendrogramas, el mejor resuelto es el de máxima parsimonia elaborado a partir de los datos de las secuencias. La explicación de que se resuelvan mejor las filogenias basadas en datos de secuencias es, simple y llanamente, que se permiten estudiar e introducir en los análisis un mayor número de caracteres.

Los métodos que mejor resuelven la filogenia de la familia Profundulidae son el método basado en distancias (Figura 5), por un lado, y el método basado en máxima parsimonia (Figura 11), por otro. Así, los dos subgéneros constituyen dos grupos soportados por elevados valores de *bootstraps* en todos los dendrogramas, excepto en el dendrograma realizado mediante máxima verosimilitud a partir de las secuencias (Figura 7), y en los filogramas resultado de aplicar máxima parsimonia a los datos aloenzimáticos (Figuras 9 y 10), donde la población Chiapas se encuentra formando una politomía con el resto de las poblaciones estudiadas que forman parte del mismo grupo soportado por un elevado valor de *bootstraps*.

Dentro del subgénero *Profundulus*, cabe señalar que no se resuelve totalmente la filogenia de la especie *P. guatemalensis*. Esta especie constituye un grupo monofilético en el dendrograma de *neighbor-joining* y en el de máxima parsimonia realizados a partir de las secuencias (Figuras 5 y 11), pero se encuentra formando politomía con otras poblaciones o grupos de poblaciones del subgénero *Profundulus*. A partir de los datos mitocondriales, se puede deducir que, si se mantiene el *status* taxonómico de *P. guatemalensis*, se deberían reconocer dentro del subgénero *Profundulus* varias especies. Por lo tanto también se podría pensar en una especiación rápida y reciente consecuencia de la cual se han producido cambios en las secuencias mitocondriales pero no ha habido tiempo para que se produzcan en las aloenzimas. Esta especiación reciente se dio hace unos dos millones de años según se puede observar en el filograma del apartado 4.8 (Figura 12).

En cuanto a la población Tehuantepec2, que posee un alelo marcador, se encuentra siempre en politomía o agrupada en los dendrogramas elaborados a partir de secuencias, con elevados valores de *bootstraps*, con la población Chacalapa.

Por otro lado, dentro de este subgénero, se observan dos grupos de poblaciones, el clado *oaxacae* y el clado *mixteco*, que además presentan alelos diagnósticos con la frecuencia más alta. Estos dos clados están soportados por elevados valores de *bootstraps* en el dendrograma de *neighbor-joining* (Figura 5), en el de máxima verosimilitud elaborado a partir de aloenzimas (Figuras 6), y en los de máxima parsimonia (Figuras 10 y 11). El clado *oaxacae* está además soportado por elevados valores de *bootstraps* en el dendrograma de máxima verosimilitud, elaborado a partir de secuencias (Figura 7). Según el filograma resultado de aplicar el reloj molecular, el grupo *mixteco* se diferenciaría hace algo más de 5 millones de año, en el Plioceno Inferior, y hubiera habido tiempo para que se fijasen alelos. Curiosamente, el grupo *oaxacae*, que también tiene alelos fijados, se diferenció recientemente en el Pleistoceno Superior.

Los grupos *este* y *balsanus*, que se diferencian en el dendrograma elaborado a partir de distancias de Rogers (Figura 3), no están soportados por *bootstraps* en ninguno de los dendrogramas elaborados.

En definitiva, dada la variabilidad genética que se observa en las poblaciones de la familia Profundulidae, deberían estudiarse más poblaciones de *P. guatemalensis* para tener la certeza de que se trata de una especie diferente de *P. punctatus*, prestando especial atención a la población Guacalate que presenta un alelo fijado. Además, deberían completarse los estudios moleculares con estudios morfológicos, y no sólo con ejemplares de poblaciones de esta especie (*P. guatemalensis*) sino con ejemplares de Tehuantepec2, ya que podría tratarse de una especie diferente.

Dentro del subgénero *Tlaloc*, la población de Chiapas (*P. hildebrandi*) forma un grupo con la población Virgen (*terra typica* de *P. mexicanus*, sinónimo de *P. labialis*) en el dendrograma elaborado a partir de las distancias de Rogers. Ningún ejemplar de la población Virgen ha podido ser secuenciado, por lo que no se ha podido incluir en los dendrogramas elaborados basados en las secuencias de los genes de las ATPasas 6 y 8. Dentro del subgénero *Tlaloc*, *P.*

hildebrandi es la especie que primero se diferencia, y es en el Plioceno Superior, hace poco más de 4 millones de años (Figura 12).

En cuanto a *P. labialis* y *P. candalarius*, aunque aparezcan como grupos separados en el dendrograma de distancias de Rogers, en el resto de dendrogramas no se diferencian, apareciendo todas las poblaciones en politomía o agrupándose de manera indiferente. En el filograma elaborado para aplicar el reloj molecular, se observa la diferenciación de la población de *P. candalarius* recientemente, en el Pleistoceno Superior (Figura 12), por lo que puede que aún no haya transcurrido el tiempo suficiente para que se hayan producido diferencias ni a nivel mitocondrial ni a nivel nuclear. Cabe mencionar que una de las poblaciones que se ha determinado como *P. labialis* (Selegua), posee un alelo fijado. Al igual que se indicaba anteriormente al discutir el subgénero *Profundulus*, deberían estudiarse más poblaciones de *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. hildebrandi*. Además, deberían completarse los estudios moleculares con estudios morfológicos, haciendo especial hincapié en los ejemplares de la población Selegua, ya que podría tratarse de una especie diferente.

En definitiva:

1. Las población Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*) no es sinónimo de *P. labialis*, como han propuesto Lazara (2001) y Miller (1955), sino de *P. hildebrandi*, ya que comparte el alelo marcador *EST-2-100** y los alelos exclusivos *AAT-1-100**, *AAT-1-110**, *6PGD-104**, *PGI-1-130**, *PGM-97** y *SOD-1-115**, con la población Chiapas (procedente de la *terra typica* de *P. hildebrandi*). Además constituyen un grupo monofilético, aunque con valores de *bootstraps* bajos, con una $F_{st}=0,414$, y mantienen una $D_{Nei}=0,171$.
2. Las poblaciones Grande y Nentón son poblaciones de la especie *P. candalarius*. Nentón es la *terra typica* de esta especie y se encuentra a unos 1000 metros en la meseta que se extiende dirección norte hacia la cuenca del Río Grande de Comitán, en la frontera de Guatemala con México. Presentan una $D_{Nei}=0,055$ y una divergencia de 0,8%; en alguno de los dendrogramas constituyen un grupo monofilético, pero con valores de *bootstraps* bajos, que presenta una F_{st} de 0,213. Comparten *CK-105** como alelo exclusivo.
3. Las poblaciones Jerónimo, Selegua y Comalatengo son poblaciones de *P. labialis*. El río San Jerónimo es la *terra typica* de la especie. Selegua y Comalatengo proceden de localidades próximas a las pertenecientes al grupo anterior, en la cuenca del Grijalva-Usumacinta. Jerónimo procede del Río San Jerónimo en las tierras altas de la Guatemala Central. La $D_{Nei}=0,106$. Presentan un alelo marcador, *CK-97**. Las poblaciones de este grupo, junto a Inés y Vergel introducidas para el análisis de secuencias, tienen una divergencia de 1,48%. Cabe señalar que la población Selegua presenta un alelo marcador.
4. Las poblaciones Polochic (*P. guatemalensis*) y Guacalate (*terra typica* de *P. guatemalensis*) pertenecen a la especie *P. guatemalensis*. Constituyen un grupo monofilético con elevados valores de *bootstraps* en alguno de los dendrogramas, aunque su posición filogenética no

queda totalmente resuelta. Presentan una $F_{st}=0,751$ y una $D_{Nei}=0,212$ que es bastante elevada debido a que se trata de dos poblaciones situadas en vertientes diferentes. Del mismo modo presentan una divergencia que también es muy elevado, 3,2%. Estas poblaciones comparten el alelo marcador *LDH-1-10**. Cabe señalar que la población de Guacalate presenta un alelo fijado y dos exclusivos.

5. Las poblaciones que constituyen el grupo *mixteco* en un principio *P. punctatus* (Atoyac5, Atoyac6, Atoyac7, Atoyac8 y Mixteco2, que proceden de arroyos en las tierras altas de la región Mixteca entre los 1600 y los 2300 metros sobre el nivel del mar y Atoyac4, población de las tierras bajas de la misma región a una altitud de 700 metros) son poblaciones de otra especie no descrita, ya que, aún sin valores de *bootstraps* significativos, constituyen un grupo monofilético, con una F_{st} de 0,421, y una $D_{Nei}=0,106$. Estas poblaciones comparten el alelo marcador *LDH-1-50** y alelo exclusivo *IDH-2-70**. Las poblaciones Atoyac5, Atoyac6, Atoyac8 y Mixteco2, que constituyen un grupo monofilético con valores de *bootstraps* elevados presentan una divergencia de 0,72%. Esta especie presenta también caracteres morfológicos diferentes y será descrita en otro lugar (Martínez, E. *com. pers.*).
6. Las poblaciones Atoyac2 y Atoyac3 del tramo medio-alto del Atoyac (*terra typica* de *P. oaxacae*) y la población del arroyo Tlaxiaco perteneciente a la cuenca del Mixteco-Balsas, forman parte de la especie *P. oaxacae*. Estas poblaciones presentan el alelo marcador *SOD-94** y constituyen un grupo monofilético con valores de *bootstraps* bajos. Tienen una $F_{st}=0,315$ y una $D_{Nei}=0,059$. Las poblaciones Atoyac3, Atoyac9 y Mixteco1 constituyen un grupo monofilético con valores elevados de *bootstraps* y una divergencia de 0,35%.
7. El resto de poblaciones que pertenecen a *P. punctatus* son, salvo Grijalva que pertenece a la vertiente atlántica, poblaciones que proceden de las tierras bajas próximas al mar en el Pacífico. En algunos de los dendrogramas constituyen un grupo monofilético, aunque con bajos valores de *bootstraps*. A la vez se divide en otros dos subgrupos, aunque el nodo no es estadísticamente significativo:
 - el grupo *este*, que comprende las poblaciones al este del istmo de Tehuantepec, desde el río Bravo en Guatemala al Chacalapa en Oaxaca (México). Las muestras del Bravo y Tolimán se colectaron en localidades próximas a la *terra typica* de *P. punctatus*. Dentro de este grupo, Tehuantepec2 se diferencia del resto de las poblaciones por la presencia un alelo marcador, *AAT-2-60**; un alelo exclusivo *AAT-1-93**; y dos alelos raros *EST-1-80** y *PGI-2-110**;
 - el grupo *balsanus*, que incluye las poblaciones al oeste del istmo de Tehuantepec, y los topotipos de *P. balsanus*, no comparten ningún alelo propio.

En general, la causa por la que no se ha obtenido una mejor resolución de los dendrogramas puede ser debido a que la divergencia de las ATPasas 6 y 8 es menor que la del citocromo b, como se comentó anteriormente, por lo que convendría secuenciar los genes que codifican para el citocromo b e intentar obtener una mejor resolución en los dendrogramas y filogenias.

Aunque la diferencia entre el tiempo de divergencia entre los genes que codifican la ATPasa 6 y 8 y el citocromo b no es elevada, el citocromo b presenta más pares de bases que la ATPasa 6 y 8, y por lo tanto más caracteres que entrarían en juego a la hora de resolver los dendrogramas y filogramas. Mattern (2004) indica que se debe ser precavido a la hora de interpretar los resultados de un estudio basado únicamente en uno o dos genes, aunque este es un primer paso para producir una hipótesis preliminar de filogenias. Es importante utilizar todos los datos moleculares de los que se disponga, incluso cuando éstos entren en conflicto unos con otros

Uno de los problemas más difíciles de resolver en los análisis filogenéticos es la reconstrucción de radiaciones rápidas que involucran cierto número de *taxa*. Si la especiación de las secuencias ocurre rápidamente, incluso asumiendo que la divergencia se da sólo vía bifurcación (*versus* hibridación, p.e), sólo unos pocos caracteres sinapomórficos estarán presentes. Los análisis de alozimas han proporcionado evidencias del aislamiento reproductivo entre formas extremadamente similares, pero por una variedad de razones, las alozimas presentan más dificultades para reconstruir relaciones evolutivas. En particular, el grado de variación presente en loci individuales es limitado, la mayor parte exhibe únicamente unas pocas electroformas y no hay presentes alelos taxon-específicos, es decir, diagnósticos, (Kornfield y Parker, 1997). La posición parafilética de algunas poblaciones que se han obtenido en los diferentes dendrogramas no implica que las filogenias nucleares y mitocondriales sean incorrectas. No todos los dendrogramas en los que se hayan obtenido *taxa* en politomía son incorrectos. La parafilia es una consecuencia inevitable de la evolución de una nueva especie. Si una población de una especie sufre especiación, las otras poblaciones de la misma especie permanecen compatibles desde un punto de vista reproductivo, y en algún momento estas especies resultan parafiléticas.

5.4. El reloj molecular

Antes de comenzar a discutir los resultados obtenidos aplicando un reloj molecular, es importante señalar que no se dispone de una historia geológica detallada para México (Marshall y Liebherr, 2000) ni de datos fósiles para *Profundulus*, por lo que existe una gran dificultad de calibrar un reloj molecular independiente para los genes examinados en este estudio. Por este motivo se ha aplicado el reloj molecular más utilizado por otros autores para las ATPasas 6 y 8 en peces. Esto hace que los resultados deban tomarse con precaución y no como estimas exactas del tiempo de divergencia si no como una aproximación a la misma.

Según se puede observar en la figura 12, la separación de los dos subgéneros se corresponde con la separación de las vertientes atlántica y pacífica (excepto la población Grijalva), y se dataría en el Mioceno Inferior. El área donde se asientan las poblaciones de *Profundulus* presenta una elevada actividad tectónica y volcánica. La provincia del istmo de Tehuantepec alcanzó su máxima actividad tectónica a partir del Mioceno, lo cual se refleja en la presencia de rocas volcánicas y en el rápido hundimiento del basamento que a su vez se manifiesta en la formación del Golfo de Tehuantepec (Aguayo, 1996). Una elevación de las montañas que diera lugar a la actual división de los ríos de las vertientes atlántica y pacífica podría ser la razón para el actual patrón de distribución de los dos subgéneros de la familia Profundulidae.

El istmo de Tehuantepec representa una barrera para muchos organismos tropicales, como es el caso de los roedores *Peromyscus aztecus*/*P. hylocetes* y *Reithrodontomys sumichrasti* que habitan las tierras altas de centroamérica (Sullivan et al., 2000). Si se piensa en un origen de la familia Profundulidae en las tierras altas de centroamérica, se podría pensar que el istmo separó los subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc*, y la presencia del subgénero *Profundulus* al este del istmo de Tehuantepec podría justificarse por dispersiones recientes. Sin embargo, con los datos obtenidos en este estudio no puede contrastarse esta hipótesis.

Como se ha mencionado anteriormente, la región del istmo de Tehuantepec ha tenido una actividad volcánica y tectónica extensiva desde el Mioceno Inferior, actividad geológica que ha generado una hidrología compleja por lo que la interpretación de la historia geológica es difícil (Doadrio y Domínguez, 2003).

Las poblaciones del grupo *mixteco* se diversificarían en el Plioceno inferior, anteriormente a la separación de *P. guatemalensis* y otras poblaciones de *P. punctatus*. Miller (1955) propuso que el subgénero *Profundulus* derivaba de *P. guatemalensis* pero los resultados de este estudio no apoyan esta conclusión porque el grupo *mixteco* se ha separado antes que *P. guatemalensis*.

Los datos de separación del resto especies de la familia Profundulidae son consistentes con las elevaciones de terreno producidas en las Tierras Altas de Chiapas y Guatemala en el Plioceno, como es el caso de la población Chiapas (*P. hildebrandi*) y con las transgresiones marinas más recientes a través del istmo de Tehuantepec producidas en el Plioceno Superior (Maldonado-Koerdell, 1964). El aislamiento de la población de *P. guatemalensis* (Polochic) puede ser debido a que la plataforma continental en la región del Motagua es muy estrecha, lo que sugiere que los ríos que desembocan allí, como el Polochic, pueden estar relativamente aislados de cuencas adyacentes, incluso durante bajadas en el nivel del mar, lo que sirve como una barrera efectiva para la dispersión de los peces (Mateos et al., 2002).

Posteriormente, en el Pleistoceno, la glaciación ha modificado los patrones bióticos (Marshall y Liebherr, 2000). Las bajadas del nivel del mar han podido propiciar rutas de dispersión marina (Mateos et al., 2002) para las especies del subgénero *Punctatus*. El hecho de que las poblaciones de los tramos bajos de ríos adyacentes sean más similares entre ellas que con poblaciones de tramos altos de la misma cuenca, puede indicar una reciente conexión costera. La esporádica presencia del subgénero *Profundulus* en las cabeceras de algunos ríos de la vertiente atlántica, como es el caso de la población Grijalva, ha sido interpretada como el resultado de capturas fluviales durante el período del Pleistoceno. La presencia de las mismas especies en las cabeceras del Mixteco-Balsas y del río Atoyac-Verde indica recientes conexiones entre ambas cuencas. Este hecho está apoyado por patrones de distribución de otros peces de agua dulce (Espinosa et al. 1993). Sin embargo la presencia de tres grupos de poblaciones bien diferenciadas con una distribución alopátrica en el río Atoyac, parece indicar un origen reciente de la actual configuración de la cuenca. El río Atoyac probablemente no era una unidad hidrogeológica durante el Cenozoico y al menos tres cuencas diferentes han formado la cuenca actual del Río Atoyac (Rodrigo, 1994). Lo mismo sucede en las cuencas del Grijalva-

Usumacinta, Mixteco y Tehuantepec, donde se encuentran las tres especies del subgénero *Tlaloc*.

Esta radiación reciente puede ser la causa de que no haya transcurrido el tiempo suficiente para que en algunos de los grupos y especies, como *P. candalarius*, se hayan fijado los alelos marcadores.

En definitiva, con los datos de los análisis filogenéticos de las secuencias de genes mitocondriales se puede aceptar la hipótesis de un sólo evento vicariante para la separación de los subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc*, pero no para la división de las distintas especies dentro de los dos subgéneros.

5.5. Resolviendo hipótesis sobre biogeografía

Se acepta que la principal forma de especiación dentro de los peces de agua dulce se produce por fenómenos de alopatría o vicarianza, en los que la formación de barreras geográficas subdivide a la población ancestral. Las formas diferenciadas se aíslan y evolucionan. La datación de estas barreras sirve de gran ayuda en la reconstrucción filogenética de las especies. Así mismo, los fenómenos de vicarianza no son excluyentes de otros procesos como la dispersión de la ictiofauna a través de las capturas fluviales (Banarescu, 1991). En la actualidad la acción humana como mecanismo de traslocación de la ictiofauna es otro factor a tener en cuenta, hecho que repercute negativamente en la posibilidad de dilucidar las relaciones filogenéticas y biogeográficas de las especies, sobre todo en zonas y grupos poco estudiados, donde no se disponen de datos previos. En bastantes casos, la datación geológica y paleontológica de estas barreras geográficas se conoce de forma global, pero en numerosas ocasiones es preciso un conocimiento más puntual para poder establecer con precisión la formación o aislamiento de un determinado taxón y su relación con las especies próximas.

Con los resultados obtenidos al aplicar a las distintas especies el test de Mantel y el análisis de dispersión y vicarianza que proporciona el programa DIVA, no se puede fijar un modelo biogeográfico concreto. Esto puede ser debido a la compleja geología y a la alta actividad tectónica que desde el Mioceno se produce en la zona. Por un lado, la correlación entre las distancias genéticas y geográficas obtenidas mediante el test de Mantel no es significativa, lo que sugiere una estructura genética más compleja que la predicha por el modelo de aislamiento por distancia. Por otro lado, los resultados de aplicar los análisis de dispersión-vicarianza tampoco aclaran nada de la biogeografía de la zona, ya que se obtienen 70 alternativas para las reconstrucciones óptimas, y además se requieren 9 dispersiones.

5.6. Propuestas de conservación

El ámbito del área de distribución de la familia Profundulidae coincide con un área de elevada biodiversidad. Es un ámbito predominantemente rural, donde viven muchas personas que en su

Discusión

mayoría padecen altos índices de marginación y pobreza extrema. Este factor, junto a otros como la falta de una integración de políticas, una normativa ambiental, una marginación presupuestal, una investigación ambiental limitada y una información ambiental insuficiente, contribuye a intensificar la problemática ambiental, donde la pérdida de diversidad biológica es una de las graves consecuencias.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten, por una lado, completar esa falta de información ambiental acerca del conocimiento de la familia Profundulidae y, por otro, contribuir a la investigación sobre la biodiversidad de la zona, abriendo camino a nuevas líneas de investigación, con la finalidad de que todo ello contribuya a la conservación de las especies que la componen.

La accidentada topografía de la zona de estudio favorece la existencia de una gran variedad de ecosistemas acuáticos, con una flora y fauna diversificadas, ricas en especies autóctonas y endémicas. Pero la biodiversidad de las aguas continentales se encuentra en la actualidad muy degradada por un manejo ineficiente y una falta de planificación (Aguilar, 2003). Son varias las causas que producen la pérdida de diversidad biológica acuática y, salvo fenómenos naturales como inundaciones o incendios, muchas de ellas están ligadas directamente a la acción del hombre. Estas causas influyen en el tamaño y la estructura genética de las poblaciones, en la capacidad de carga de los ecosistemas que las albergan consecuencia de la pérdida de hábitats, en los cambios en la calidad de los mismos y en su fragmentación.

Así, la sobreexplotación de recursos naturales e hídricos, como sucede en algunos ojos de agua próximos a la *terra typica* de *P. candalarius*; los cambios de uso de los ecosistemas acuáticos convirtiendo algunos de ellos en zonas de baño, por ejemplo; unas prácticas agrarias perniciosas, con uso de pesticidas y/o herbicidas, como es el caso de la población Guacalate, procedente de la *terra typica* de *P. guatemalensis*, rodeada de cultivos intensivos de frambuesas para exportación; la introducción de especies exóticas invasoras; las actividades que aceleran la erosión y propician la colmatación de ecosistemas acuáticos; o los vertidos a los ríos (el río Atoyac, por ejemplo, es un río muy contaminado), son el origen de una degradación de la biodiversidad acuática. Resulta necesario y urgente tomar acciones decididas y definir unos límites al deterioro ambiental mediante la instrumentación de unas políticas serias de ordenamiento ecológico y de un manejo sostenido (Aguilar, 2003).

Las especies de distribución restringida son más vulnerables a la extinción como resultado de actividades antropogénicas que destruyen o modifican el ambiente (Soulé, 1986; Ceballos y Navarro, 1991; Gaston, 1994). Existen varias implicaciones generales para la conservación de la diversidad biológica que se desprenden de los análisis preliminares de estas especies. En primer lugar, es evidente que la mayoría de las especies que se han descrito o registrado en esta zona en la última década, son de distribución restringida. Las tasas de descubrimiento de tales especies indican que es posible esperar el descubrimiento de un número todavía considerable de especies de reptiles, anfibios y peces. Como consecuencia de su limitada distribución, tales especies pueden desaparecer al ocurrir un único evento natural, como un incendio, o al desarrollarse un único proyecto significativamente impactante, como una carretera o presa. Dadas las enormes

tasas de deforestación y contaminación de la zona, es fácil suponer que el número de especies extinguidas y en riesgo de extinción sea mucho mayor que el conocido o estimado. La extinción de especies es una crisis más grave de lo que comúnmente se considera, incluso por los especialistas (Ceballos, 2001).

A lo limitado del área de distribución hay que sumar lo comentado anteriormente acerca de la falta de información ambiental, donde se englobaría la falta de conocimiento de la diversidad biológica. En la zona estudiada se están descubriendo nuevas especies que representan o bien nuevas citas de distribución de especies, o bien nuevos *taxa* para la ciencia, por lo que no es sorprendente que la mayoría de estas especies sean de distribución restringida. Desgraciadamente, muchas de estas especies han sido descubiertas cuando ya se habían extinguido o estaban seriamente amenazadas. Un ejemplo es la especie extinguida *Cyprinodon inmemoriam*, que habitaba un manantial de pocos metros cuadrados en el Bolsón de la Sandía, en Nuevo León (Ceballos, 2001). No se puede permitir que suceda lo mismo con las de la familia Profundulidae.

La conservación de la diversidad biológica requiere políticas explícitas que promuevan el establecimiento de lugares de protección y reservas naturales en los ámbitos de comunidad, municipio, estado y país, para la protección de las especies. Es evidente, sin embargo, que sólo deteniendo y revirtiendo el deterioro ambiental podrá salvaguardarse la herencia biológica de la zona (Ceballos, 2001).

La concentración de vertebrados de distribución restringida es heterogénea. En general, sobresalen por su número de especies algunas regiones como los bosques templados de la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico, las selvas altas de Los Tuxtlas en Veracruz, las selvas bajas caducifolias del oeste y las islas del Golfo de California y del Pacífico. El caso de los peces de zonas áridas es muy interesante, ya que las condiciones de aislamiento a las que han estado sometidos ha causado que un número notable de manantiales tengan especies endémicas, de distribuciones muy restringidas (Ceballos, 2001). Algunas de las poblaciones de las especies estudiadas en el presente trabajo también se encuentran aisladas, ya que habitan ojos de agua, como Nentón (procedente de la *terra typica* de *P. candalarius*), o cabeceras de arroyos, como Tehuantepec2.

La mayor parte de las especies de la familia Profundulidae son especies de distribución restringida, y por lo tanto deberían considerarse prioritarias en los programas de conservación, como es el caso de *Profundulus hildebrandi*, *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. guatemalensis*. Lo mismo sucede con las poblaciones del grupo *mixteco* y de *P. oaxacae*, cuyo área de distribución se limita a la región Mixteca, una de las áreas de México más erosionadas y con sus ecosistemas acuáticos más amenazados. En cuanto a poblaciones especialmente frágiles, por lo tanto objeto de conservación, caben destacar las dos poblaciones de *P. guatemalensis*, Polochic, por un lado, que tiene una variabilidad genética muy baja, y Guacalate, por otro, que procede de la *terra typica*, ya que posee alelos propios; y las poblaciones Selegua y Tehuantepec2, que poseen alelos propios fijados y que pudieran ser especies aún por describir.

6. Conclusiones

La información obtenida con las técnicas moleculares, aplicadas al estudio del género *Profundulus*, ha aportado datos relevantes para el conocimiento de la familia Profundulidae. A partir de los resultados obtenidos se sientan las bases para proponer una nueva clasificación de este grupo, se infieren sus relaciones de parentesco y se propone un modelo evolutivo para la familia Profundulidae.

Las conclusiones más relevantes que se obtienen de este estudio son las siguientes:

1. La variabilidad genética de las especies del género *Profundulus*, aún encontrándose entre los valores citados en la literatura científica, es elevada. Para *Profundulus punctatus*, esta variabilidad genética se debe a que, probablemente, el conjunto de poblaciones estudiadas asignadas a esta especie engloba poblaciones de especies diferentes. Las diferencias entre los subgeneros *Tlaloc* y *Profundulus* en cuanto a los parámetros de variabilidad genética, es significativa, siendo más elevados en el subgénero *Tlaloc*.
2. La estructuración de las poblaciones que pertenecen a *P. punctatus*, *P. guatemalensis*, *P. labialis* y *P. candalarius* se debe en mayor medida a la interrupción del flujo génico que a la endogamia. En cambio en los dos grupos de poblaciones de la región Mixteca que comparten alelos de diagnósticos, la estructuración las poblaciones se debe a la existencia de cruzamientos entre individuos, lo que indica una subdivisión dentro de las poblaciones y de cruzamientos dirigidos no producidos al azar.
3. En cuanto a la posición taxonómica de los dos subgéneros *Profundulus* y *Tlaloc*, y tras estudiar las distancias genéticas, tanto nucleares como mitocondriales, se tienen evidencias suficientes para elevar su clasificación a nivel de género. Así, la familia Profundulidae ya no sería monogénica, tal y como se considera hasta el momento, y estaría formada por los géneros *Profundulus* y *Tlaloc*.
4. En cuanto a la posición taxonómica del género *Profundulus*:
 - 4.1 No existe congruencia entre los datos moleculares obtenidos en este estudio y los morfológicos (Miller, 1955) en relación a las poblaciones de la especie *P. punctatus*, debido a que molecularmente se observan grupos bien diferenciados y no una variación clinal continua, como ocurre con los caracteres morfológicos. Dentro de las poblaciones incluidas por Miller (1955) como *P. punctatus* se encuentran dos grupos monofiléticos bien definidos tanto por la presencia de caracteres moleculares propios como por sus distancias genéticas. Estos dos linajes pertenecen a los grupos de poblaciones llamadas en esta tesis doctoral como grupos *mixteco* y *oaxaca*. El grupo *mixteco* debe constituir una especie diferente de *P. punctatus* que no ha sido descrita formalmente hasta el

momento. La especie *P. oaxacae* (Meek, 1902) considerada sinónima por Miller (1955) debe ser considerada una especie válida e incluye a todas las poblaciones que se denominan en esta tesis doctoral como grupo *oaxacae*.

- 4.2 Existen evidencias genéticas para pensar que la población Tehuantepec2 podría tratarse de una especie nueva.
 - 4.3 A pesar de que las poblaciones Guacalate y Polochic (*terra typica* de *P. guatemalensis*) compartan un alelo marcador, lo que está en congruencia con los estudios de Miller (1955) basados en datos morfométricos y merísticos, la población de Guacalate presenta un alelo propio fijado, por lo que antes de resolver la posición taxonómica de la especie *P. guatemalensis* deberían completarse los estudios moleculares con un aumento del número de poblaciones, con estudios morfológicos de estas poblaciones y con estudios de secuencias de otros genes como el citocromo b para ejemplares de todas las poblaciones.
5. En cuanto a la posición taxonómica del género *Tlaloc*:
- 5.1 La población Virgen (procedente de la *terra typica* de *P. mexicanus*, México), que en un principio se determinó como *P. labialis* siguiendo a Lazara (2001) y a Miller (1955) es genéticamente similar a la población de *P. hildebrandi* de San Cristobal de las Casas (México) que pertenece a la *terra typica* de la especie. Una revisión posterior de los caracteres morfológicos de ambas poblaciones llevan a considerar que las diferencias no son suficientes para considerarlas como diferentes y ambas deben incluirse en *P. hildebrandi*.
 - 5.2 La filogenia no resuelve totalmente la monofilia de las especies *P. labialis* y *P. candalarius*. Se ha encontrado un alelo marcador para las poblaciones de *P. labialis* lo que está en congruencia con los estudios de Miller (1955) basados en datos morfométricos y merísticos, aunque la población Selegua presenta un alelo fijado, por lo que antes de resolver la posición taxonómica *P. labialis* deberían completarse los estudios moleculares con un aumento del número de poblaciones, con estudios morfológicos de estas poblaciones y con estudios de secuencias de otros genes para ejemplares de todas las poblaciones. No se ha encontrado ningún alelo marcador para las poblaciones de *P. candalarius*.
6. La distribución de las especies estudiadas es la propuesta por Miller (1955), ampliada a algunas cuencas según los resultados del trabajo de campo desarrollado para este estudio tal y como se muestra en la Figura 13. Se han de tener en cuenta los nuevos grupos de poblaciones que podrían tratarse de especies nuevas.
7. La diferenciación de los dos subgéneros de *Profundulus*, se produce en el Mioceno Inferior (22-23 Ma). Una elevación de las montañas que diera lugar a la actual división de los ríos de las vertientes atlántica y pacífica podría ser la razón para el actual patrón de distribución de los dos subgéneros de la familia Profundulidae.

Conclusión

8. En el Plioceno Inferior (5 Ma), se diferencia el grupo *mixteco* del resto de poblaciones de *P. punctatus* y de *P. guatemalensis*, lo que no apoya la propuesta de Miller (1955) de que el subgénero *Profundulus* derivaba de *P. guatemalensis*.
9. En el Plioceno Inferior (4 Ma), se produce la separación de *P. hildebrandi* de *P. labialis* y *P. candalarius*, coincidiendo con las hipótesis de Miller (1955).
10. En el Plioceno Superior (2-3 Ma) se produce una radiación de las poblaciones Maniatepec, Papagayo1, Papagayo2, Colotepec1 (todas ellas *P. punctatus*), Polochic (*P. guatemalensis*), un grupo con las poblaciones Tolimán y Bravo (*P. punctatus*) y otro con las poblaciones del grupo *oaxacae*, Tehuantepec1, Tehuantepec2, Chacalapa, Grijalva y Novillero.
12. En el Cuaternario (Pleistoceno-Holoceno) se separan las poblaciones Tehuantepec1, Novillero y Grijalva por un lado (Pleistoceno Inferior), Tehuantepec2 y Chacalapa por otro (Pleistoceno Superior-Holoceno), y el grupo *oaxacae* por otro (Pleistoceno Superior-Holoceno).
13. En este mismo período se produce la separación de la población de *P. candalarius* (Nentón) de las de *P. labialis* (Ines y Vergel) (Pleistoceno Superior-Holoceno), coincidiendo con las hipótesis de Miller (1955).
14. La presencia de las mismas especies en las cabeceras del Mixteco-Balsas y del río Atoyac-Verde indica recientes conexiones entre ambas cuencas. La presencia de la población de *P. punctatus*, Grijalva, en el río Chiquito en la cuenca del Grijalva-Usumacinta, puede ser interpretada como una captura reciente. Sin embargo la presencia de grupos de poblaciones o poblaciones bien diferenciadas con una distribución alopátrica en los ríos Atoyac, Mixteco, Tehuantepec y Grijalva-Usumacinta, parece indicar un origen reciente de la actual configuración de estas cuencas.
15. Hay evidencias suficientes para afirmar que se ha producido una especiación rápida y reciente, consecuencia de la cual, para algunas especies, se han registrado cambios a nivel mitocondrial pero no a nivel nuclear.
16. La mayor parte de las especies de la familia Profundulidae son especies de distribución restringida, y por lo tanto deberían considerarse prioritarias en los programas de conservación, como es el caso de *Profundulus hildebrandi*, *P. labialis*, *P. candalarius* y *P. guatemalensis*. Lo mismo sucede con las poblaciones del grupo *mixteco* y de *P. oxacae*, cuyo área de distribución se limita a la región Mixteca, una de las áreas de México más erosionadas y con sus ecosistemas acuáticos más amenazados. En cuanto a poblaciones especialmente frágiles, por lo tanto objeto de conservación, caben destacar las dos poblaciones de *P. guatemalensis*, Polochic, por un lado, que tiene una variabilidad genética muy baja, y Guacalate, por otro, que procede de la terra typica, ya que posee alelos propios;

y las poblaciones Selegua y Tehuantepec2, que poseen alelos propios fijados y que pudieran ser especies aún por describir.

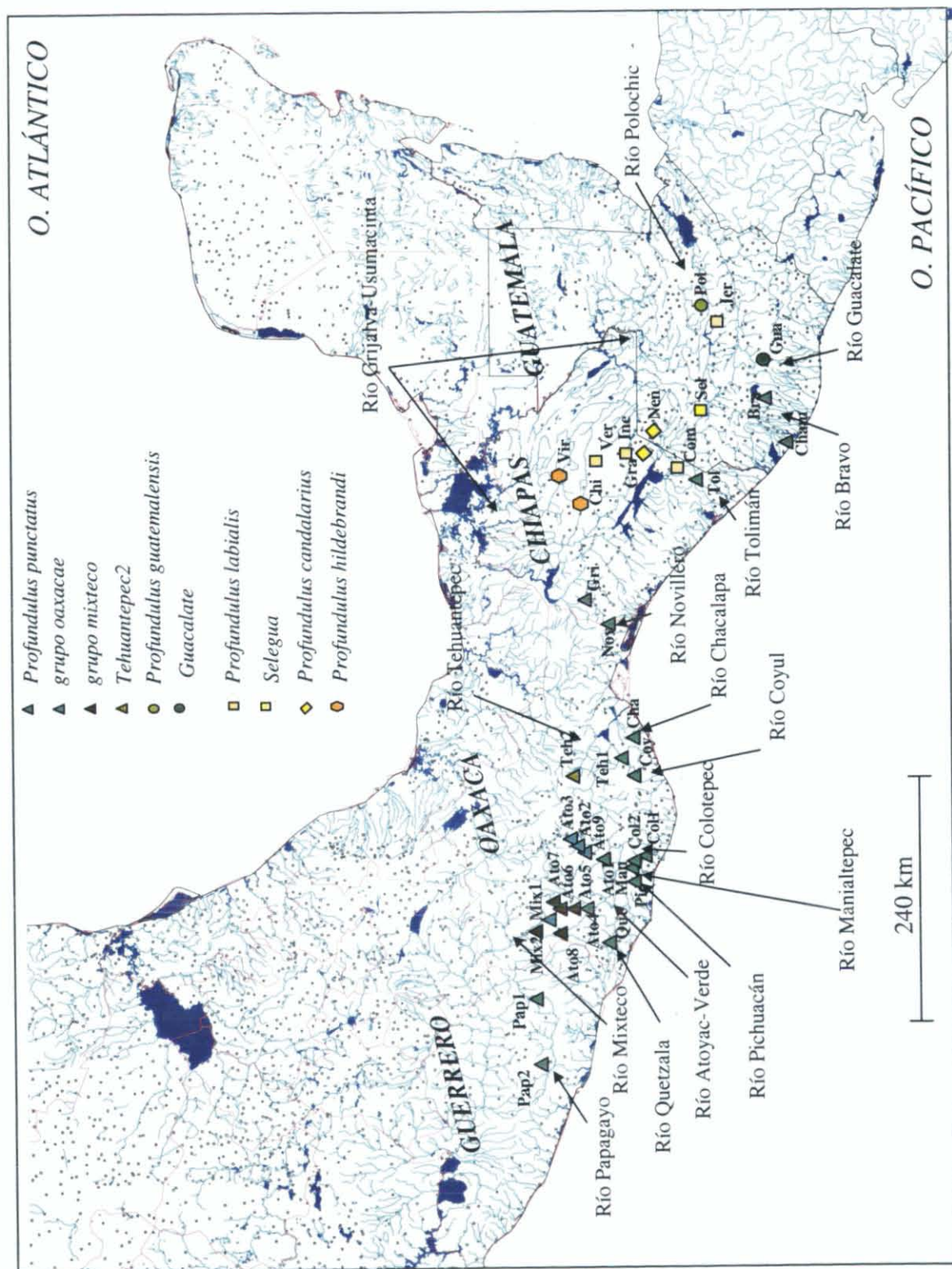
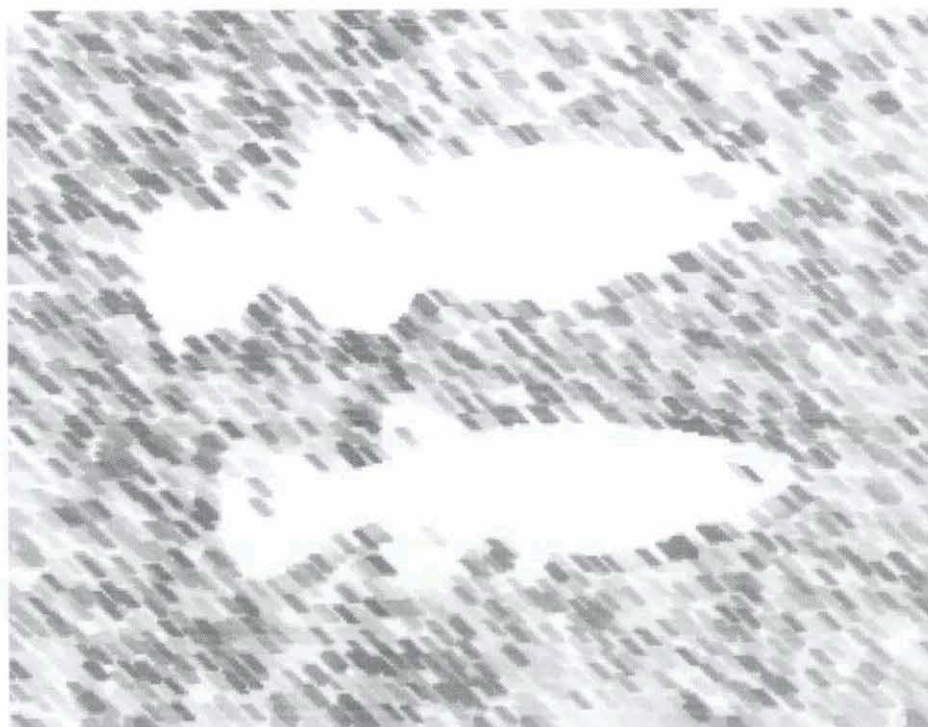


Figura 13: Distribución geográfica de las distintas especies reales o potenciales de la familia Profundulidae, según las conclusiones obtenidas en este estudio



7. Bibliografía

- Achari, A., Marshall, S.E., Muirhead, H., Palmier, R.H. y Noltman, E.A. (1981). Glucose 6-phosphate isomerase. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B*, 293, 145-157.
- Agnèse, J.F., Adépo-Gourène, B., Abban, E. K. y Fermon, Y. (1997). Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity*, 79, 88-96.
- Aguayo, J.E. y Trápala, R. (1996). *Geodinámica de México y minerales del mar. Biblioteca digital. La Ciencia para todos*.
<<http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/141/htm/geodina.htm>>.
- Aguilar, V. (2003). Aguas continentales y diversidad biológica de México: un recuento actual. *Biodiversitas*, 8(48), 1-15.
- Ahl, E. (1935). Über eine Fische Sammlung aus Mexico. *Sber. Ges. Naturf. Freunde*, 107-112.
- Alcaide, M. (1998). *Estudio de la variabilidad genética en las especies mexicanas del género Rhamdia (Pisces, Pimelodidae) mediante el uso de aloenzimas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- Allibone, R.M., Crowl, T.A., Holmes, J.M., King, T.M., McDowall, R.M., Townsend, C.R. y Wallis, G.P. (1996). Isozyme analysis of *Galaxias* species (Teleostei: Galaxiidae) from the Taieri River, South Island, New Zealand: A species complex revealed. *Biol. J. Linn. Soc.*, 57, 107-127.
- Álvarez, J. y Carranza J. (1951). Descripción de un género y especie nuevos de peces Ciprinodontidos procedentes de Chiapas (Mexico). *Ciencia*, 9(1-2), 40-42.
- Alves, M.J. y Coelho, M.M. (1994). Genetic variation and population subdivision of the endangered Iberian cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. *J. Fish Biol.*, 44, 627-638.
- Aquadro, C.F. y Avise, J.C. (1982). An assessment of "hidden" heterogeneity within electromorphs at three enzyme loci in deer mice. *Genetics*, 102, 269-284.
- Avise, J.C. (1974). Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23, 465-481.
- Avise, J.C. (1977). Genic heterozygosity and rate of speciation. *Paleobiology*, 3, 422-432.

- Avise, J.C. (1980). Diferenciación genética durante la especiación. En: *Evolución Molecular*. F.J. Ayala (Ed.). Omega. Barcelona.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall (Eds.). New York.
- Avise, J. C. y Aquadro, F.C. (1982). A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates. Patterns and Correlations. *Evol. Biol.*, 15, 151-185.
- Avise, J.C., Bermingham, E., Kessler, L.G. y Saunders, N.C. (1984). Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Evolution*, 38, 931-941.
- Avise, J.C. y Selander, R.K. (1972). Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution*, 26, 1-19.
- Avise, J.C. y Smith, M.H. (1977). Gene frequency comparisons between sunfish (Centrarchidae) populations at various stages of evolutionary divergence. *Syst. Zool.*, 26, 319-335.
- Ayala, F.J. (1983). Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. *Experientia*, 39, 813-823.
- Ayala, F.J. (1986). On the virtues and pitfalls of the molecular evolutionary clock. *J. Hered.*, 77, 226-235.
- Ayala, F. J. (1994). *La Teoría de la Evolución*. Ed. Temas de Hoy.
- Banareescu, P. 1991. Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia. Vol. 2. En: *Zoogeography of Fresh Waters*. AULA-Verlag. Germany.
- Barbadilla, A., King, L.M, y Lewontin, R.C. (1996). What does electrophoretic variation tell us about protein variation? *Mol. Biol. Evol.*, 13, 427-432.
- Baum, D.A. y Donogue M.J. (1995). Choosing among alternative 'phylogenetic' species concepts. *Syst. Bot.*, 20(4), 560-573.
- Beacham, T.D. y Withler, R.A. (1985). Heterozygosity and morphological variability of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in southern British Columbia. *Heredity*, 54, 313-322.

- Bean, T.H. (1887). Descriptions of five new species of fishes sent by Prof. A. Dugès from the province of Guanajuato, Mexico. *P. US. Nat. Mus.*, 10, 370-375.
- Benharrat K., Pasteur, N., Siau, K., Pasteur, N., Siau, Y. y Bouain, A. (1983). Polymorphisme biochimique des loups (*Dicentarchus labrax*) originaires de quatre populations naturelles et d'un élevage. *Compte-Rendu des Travaux du GIS-ARM*, 1.
- Berlocher, S.H. y Swofford, D.S. (1997). Searching for phylogenetic trees under the frequency parsimony criterion: an approximation using generalized parsimony. *Syst. Biol.*, 46, 209-213.
- Bermingham, E. y Martin A.P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.*, 7, 499-517.
- Bermingham, E., McCafferty, S.S. y Martin, A.P. (1997). Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. En: *Molecular Systematics of Fishes*. T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
- Bernardi, G. y Powers, D.A. (1995). Phylogenetic relationships among nine species from the genus *Fundulus* (Cyprinodontiformes, Fundulidae) inferred from sequences of the cytochrome b gene. *Copeia*, 2, 469-473.
- Bessman S.P. y Carpenter, C.L. (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 831-62.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1522.
- Bonhomme, F., Catalan, J., Britton-Davidian, J., V.M., C., Moriwaki, K., Nevo, E. y Thaler, L. (1984). Biochemical diversity and evolution in the genus *Mus*. *Biochem. Genet.*, 22, 275-303.
- Bonnell, M.L. y Selander, R.K. (1974). Elephant seals: genetic variation and near extinction. *Science*, 184, 908-909.
- Briggs, J.C. (1984). Freshwater fishes and biogeography of Central America and the Antilles. *Syst. Zool.*, 33(4), 428-435.

- Briggs, J.C. (1986). Introduction to the zoogeography of North American fishes. En: *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. C.H. Hocutt y E.O. Wiley (Eds.). John Wiley & Sons. New York.
- Briggs, J.C. (1987). *Biogeography and plate tectonics*. Elsevier. Amsterdam.
- Brooks, D.R. y McLennan, D.A. (1991). *Phylogeny, ecology and behavior: a research program in comparative biology*. University of Chicago Press. Chicago.
- Brown, W., George, Jr.M. y Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 1967-1971.
- Buckley, D. (1996). *Estudio de la variabilidad genética de las ranas verdes norteafricanas: constatación del límite meridional del complejo esculenta*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Bullini, L. y Sbordoni, V. (1980). Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference. *Boll. Zool.*, 47(supl.), 95-112.
- Burr, B.M. y Mayden, R.L. (1992). Phylogenetics and North American fishes. En: *Systematics, Historical Ecology & North American Freshwater Fishes*. L. Richard y L. Mayden (Eds.). Stanford University Press. Stanford. California.
- Bussing, W.A. (1998). *Peces de las aguas continentales de Costa Rica*. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica.
- Buth, D.G., (1983). Duplicate isozyme loci in fishes: origins, distribution, phyletic consequences and locus nomenclature. En: *Isozymes: current topics in biological and medical research*. M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios y G. S. Whitt (Eds.). Alan R. Liss. New York.
- Buth, D.G. (1984). Allozymes of the Cyprinid fishes. Variation and application. En: *Evolutionary Genetics of Fishes*. B.J. Turner (Ed.). Plenum Press. New York.
- Buth, D.G., Dowling, T.E. y Gold, J.R. (1991). Molecular and cytological investigations. En: *Cyprinid fishes. Systematics, biology and exploitation*. I.J. Winfield y J.S. Nelson (Eds.). Chapman y Hall. London.
- Caballero, A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73, 657-679.

- Cavalli-Sforza, L.L. y Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: modes and estimation procedures. *Evolution*, 21, 550-570.
- Ceballos, G (2001). Especies raras, el conocimiento de la diversidad biológica y la conservación. *Biodiversitas*, 6(38), 9-13.
- Chakraborty, R. y Nei, M. (1977). Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. *Evolution*, 31, 347-356.
- Chakraborty, R. y Yokoyama, S. (1978). Heterozygosity and monomorphism reconsidered. *Heredity*, 41, 327-356.
- Coyne, J.A. (1982). Gel electrophoresis and cryptic proteinvariation. Isozymes. *Curr. Topic Biol. Med. Res.*, 6, 1-32.
- Cracraft, J. (1988). Deep-history biogeography: retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Syst. Zool.*, 37, 221-236
- Croizat, L. (1958). Panbiogeography. Publicado por el autor. Caracas.
- Croizat, L. (1964). Space, time, form: the biological synthesis. Publicado por el autor. Caracas.
- Croizat, L., Nelson, G.J. y Rosen, D.E. (1974). Centers of origin and related concepts. *Syst. Zool.*, 22(2), 265-287.
- Crother, B.I. (1990). Is 'some better than none' or do allele frequencies contain phylogenetically useful information. *Cladistics*, 6, 277-281.
- Danzmann, R. G. (1986). Does enzyme heterozygosity influence developmental rate in rainbow trout?. *Heredity*, 56, 417-425.
- Darlington, P.J. (1957). *Zoogeography, the geographical distribution of Animals*. Wiley and Sons. New York.
- Davis, J.I. y Nixon, K.C. (1992). Population, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.*, 41, 421-435.

- DeBry, R. y Slade, N.A. (1985). Cladistic analysis of restriction endonuclease cleavage maps within a maximum-likelihood framework. *Syst. Zool.*, 34, 21-34.
- Doadrio, I., Perdices, A. y Machordom, A. (1996). Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environ. Biol. Fish.*, 45, 259-271.
- Doadrio, I. y Carmona, J.A. (1998). Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. *J. Fish Biol.*, 53, 591-613.
- Doadrio, I., Carmona, J.A. y Fernández Delgado, C. (2002). Morphometric study of the Iberian *Aphanius* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes), with description of a new species. *Folia Zool.*, 51, 67-79.
- Doadrio, I. y Domínguez, O. (2003) Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* En prensa Disponible on line 14 de Octubre de 2003.
- Donogue, M.J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 88, 172-181.
- Dowling, T.E. y Brown, W.M. (1989). Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of filogenetic resolution among four minnow species (Notropis: Cyprinidae). *Syst. Zool.*, 38, 126-143.
- Duggins, Jr. C.F. (1983). Electrophoretic variation in the killifish genus *Lucania*. *Copeia*, 2, 564-570.
- Durand, J.D., Templeton, A.R., Guinand, B., Imsiridou, A. y Bouvet, Y. (1999). Nested clade and phylogeographic analyses of the chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: Implications for Balkan Peninsula biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13, 566-580.
- Echelle, A.A., Echelle, A.F. y Edds, D.R. (1987). Population structure of four pupfish species (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*) from the Chihuahuan desert region of New Mexico and Texas: allozymic variation. *Copeia*, 1987, 668-681.
- Echelle, A.A. y Echelle, A.F. (1993). Allozyme perspective on mitochondrial DNA variation and evolution of the Death Valley pupfishes (Cyprinodontidae: *Cyprinodon*). *Copeia*, 275-287.

- Echelle, A.A. y Echelle, A.F. (1998). Evolutionary relationships of pupfish in the *Cyprinodon eximius* complex (Atherinomorpha: Cyprinodontiformes). *Copeia*, 4, 852-865.
- Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics. Philadelphia.
- Efron, B. y Gong, G. (1983). A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Am. Stat.*, 37, 36-48.
- Efron, B. y Tibshirani, R.J. (1993). *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman & Hall. New York.
- Eschmeyer, W.N. (1990). *Catalog of the genera of recent fishes*. California Academy of Sciences. San Francisco.
- Espinosa Pérez, H., Dillanes, M.T.G. y Mata, P.F. (1993). *Listados faunísticos de México. III. Los peces dulceacuícolas mexicanos*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.
- Faith D.P. (1985). Distance methods and the approximation of most-parsimonious trees. *Syst. Zool.*, 34, 312-325.
- Farris, J.S. (1968). *The evolutionary relationships between the species of the killifish genera Fundulus and Profundulus (Teleostei: Cyprinodontidae)*. Ph. D. dissertation. University of Michigan.
- Farris, J.S. (1970). Method for computing Wagner trees. *Syst. Zool.*, 19, 83-92.
- Farris, J.S. (1972). Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.*, 106, 645-668.
- Farris, J.S. (1977). Phylogenetic analysis under Dollo's Law. *Syst. Zool.*, 26, 77-88.
- Farris, J.S. (1979). The informative content of the phylogenetic system. *Syst. Zool.*, 28, 483-519.

- Felsenstein, J. (1978a). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.*, 27, 401-410.
- Felsenstein, J. (1978b). The number of evolutionary trees. *Syst. Zool.*, 27, 27-33.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17, 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c. <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Departament of Genetics, University of Washington. Seattle.
- Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodöhl, P.A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P. y Hynes, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.*, 47 (Suppl. A), 103-126.
- Fernández Perdices, A.I. (1997). *Filogenia y evolución molecular de la familia Cobitidae en Europa*. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst. Zool.*, 19, 99-113.
- Fitch, W.M. (1977). Phylogenies constrained by cross-over process as illustrated by human hemoglobins in a thirteen cycle, eleven amino-acid repeat in human apolipoprotein A-I. *Genetics*, 86, 623-644.
- Fitch, W.M y Atcheley, W.R. (1985). Evolution in inbred strains of mice appears rapid. *Science*, 228, 1169-1175.
- Fowler, H.W. (1936). Zoological Results of the George Vanderbilt African expedition of 1934. Part 3. The Freshwater Fishes. *P. Acad. Nat. Sci. Philad.*, 88, 243-335.
- Fuerst, P.A., Chakraborty, R. y Nei, M. (1977). Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. I. Distribution of single locus heterozygosity. *Genetics*, 86, 455-483.

- Gaggiotti, O.E. (1996). Population genetic models of source-sink metapopulations. *Theor. Popul. Biol.*, 50, 178-208.
- Gaudant, J. (1981). Un nouveau Cyprinodontidae (poisson téléostéen) de l'Oligocène inférieur de Kleinkems (Pays de Bade, Allemagne): *Prolebias rhenanus* nov. sp. *Sci. Geol. Bull.*, 34, 3-12.
- Gaudant, J. (1989). Découverte d'une nouvelle espèce de poissons cyprinodontiformes (*Prolebias delphinensis* nov. sp.) dans l'Oligocène du bassin de Montbrun-les-Bains (Drôme). *Geologie méditerranéenne* 16 (4): 355-367.
- García, G., Wlasiuk, G. y Lessa, E.P. (2000). High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 129, 93-110.
- García-Marín, J.L., Vila, A. y Pla, C. (1990). Genetic variation in the Iberian toothcarp, *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes). *J. Fish Biol.*, 37 (Supl. A), 233-234.
- Garman, S. (1895). The cyprinodonts. *Mem. Mus. Comp. Zool. Harv. Univ.*, 19, 1-178.
- Girard, C. F. (1854). Observations upon a collection of fishes made on the Pacific Coast of the United States, by Leut. W. P. Trowbridge, U.S.A., for the museum of the Smithsonian Institution. *P. Acad. Nat. Sci. Philad.*, 7, 142-156.
- González-Villaseñor, L.I. y Powers, D.A. (1985). A multilocus system for studying tissue and subcellular specialization. The three NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes of the fish *Fundulus heteroclitus*. *J. Biol. Chem.*, 260, 9106-9113.
- González Carmona, J.A. (1997). Evolución y modelos de reproducción en un organismo unisexual de la península Ibérica: El complejo *Tropidophoxinellus alburnoides*. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Günther, A. (1866). *Catalog of Fishes in the British Museum*. British Museum. London.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-561.
- Hänfling, B. y Brandl, R. (2000). Phylogenetics of european cyprinids: insights from allozymes. *J. Fish Biol.*, 57, 265-276.

- Harper, P. C. (1978). The plasma protein of some albatrosses and petrels as an index of relationship in the Procellariiformes. *New Zeal. J. Zool.*, 5, 509-548.
- Hartl, D.L. (1981). *A Primer Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts.
- Hartl, D.L. y Clark, A.G. (1989). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland. Massachusetts.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 21, 160-174.
- Hedges, S.B. (1996). Historical biogeography of West Indian Vertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 27, 163-96.
- Hedges, S.B. y Burnell K.L. (1990). The Jamaican radiation of *Anolis* (Sauria: Iguanidae): an analysis of relationships and biogeography using sequential electrophoresis. *Carib. J. Sci.*, 26, 31-44.
- Hedges, S.B., Hass, C.A. y Maxson, L.R. (1994). Towards a biogeography of the Caribbean. *Cladistics*, 10, 43-55.
- Hendy, M.D. y Penny, D. (1982). Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math. Biosci.*, 59, 277-290.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press. Urbana.
- Hernández-Martich, J.D. y Smith, M.H. (1990). Patterns of genetic variation in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki* Girard) from the piedmont and coastal plain of three drainages. *Copeia*, 1990, 619-630.
- Highton, R. (1990). Taxonomic treatment of genetically differentiated populations. *Herpetologica*, 46, 114-124.
- Highton, R. y Hedges, S.B. (1995). Geographic protein variation in *Pseudacris brimleyi* (Anura: Hylidae) analysis by sequential electrophoresis. *J. Herpetol.*, 29, 351-357.
- Hillis, D.M. y Bull, J.J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.*, 42, 182-192.

- Hillis, D.M., Bull, J.J., White, M.E., Badgett, M.R. y Molineux, I.J. (1992). Experimental phylogenetics: generation of a known phylogeny. *Science*, 255, 589-592.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P. y Cunningham, C.W. (1994). Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*, 264, 671-677.
- Hillis, D. M., Mable, B. K., y Moritz, C. (1996). Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. *Molecular systematics* 2nd ed., Hillis, D. M., Mable, B. K., and Moritz, C. (Eds.). Sunderland.
- Hoedeman, J.J. y Bronner, F.J. (1951). De orde van de tandkarpertjes. VI. Cyprinodontiformes Berg. 1940. *Het Aquarium*, 1, 1-3.
- Holder, M. y Lewis, P.O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Genetics*, 275-384.
- Hubbs, C.L. (1924). Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 13, 1-31.
- Hubbs C.L., Miller R.R. y Hubbs L.C. (1974). Hydrographic history and relict fishes of the North-Central Great Basin. *Mem. California Acad. Sci.* 7: 259 pp.
- Hubbs, C.L. y Turner, C.L. (1939). Studies of the fishes of the order Cyprinodontes. XVI. A revision of the Goodeidae. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 42, 1-80.
- Huber, J.H. (1996). *Liste actualisée des noms taxonomiques, des localités de pêche et des références bibliographiques des poissons cyprinodontes ovipares (Atherinomorpha, Pisces)*. Société Française d'Ichtyologie. Paris.
- Huelsenbeck, J.P. y Ronquist, F.R. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Huelsenbeck, J.P. y Crandall, K.A. (1997). Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 28, 437- 466.
- Humphries, C.J. y Parenti, L. (1986). *Cladistic Biogeography*. Clarendon Press. Oxford.
- Johnson, J.B. (2001). Hierarchical organization of genetic variation in the Costa Rican livebearing fish *Brachyrhaphis rhabdophora* (Poeciliidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 72, 519-527.

- Karakousis, Y., Machordom, A., Doadrio, I. y Economidis, P.S. (1995). Phylogenetic relationships of *Barbus peloponnesius* Valenciennes, 1842 (Osteichthyes: Cyprinidae) from Greece and other species of the genus *Barbus* as revealed by allozyme electrophoresis. *Biochem. Syst. Ecol.*, 23, 365-375.
- Katoh, M. y Foltz, D.W. (1994). Genetic subdivision and morphological variation in freshwater snail species complex formerly referred to as *Viviparus georgianus* (Vea). *Biol. J. Linn. Soc.*, 53, 73-90.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624-626.
- Kimura, M. (1979). The neutral theory of molecular evolutions. *Sci. Am.*, 241, 98-126.
- Kimura, M. y Ohta, T. (1971). Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, 229, 467-469.
- King, D.P.F. (1985). Enzyme heterozygosity associated with anatomical character variance and growth in the hering (*Clupea harengus* L.). *Heredity*, 54, 289-296.
- Kirpichnikov, V.S. y Muske, G.A. (1980). The adaptative value of biochemical polymorphisms in animal and plant populations. *Genetica*, 52/53, 183-193.
- Kocher, T.D. y Carleton, K.L. (1997). Base substitution in fish mitochondrial DNA: patterns and rates. En: *Molecular Systematics of Fishes*. T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
- Kornfield, I. y Parker, A. (1997). Molecular systematics of a rapidly evolving species flock: The mbuna of Lake Malawi and the search for phylogenetic signal. En: *Molecular Systematics of Fishes*. T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
- Kluge, A.G. y Farris, J.S. (1969). Quantitative Phyletics and the Evolution of Anurans. *Syst. Zool.*, 18, 1-32.
- Kumar, S. (1996). *PHYLTEST: A program for testing phylogenetic hypothesis*. The Pennsylvania State University: Institute of Molecular Evolutionary Studies and Department of Biology.
- Larget, B. y Simon, D.L. (1999). Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 750-759.

- Lazara, K.J. (2001). *The killifishes, an annotated checklist, synonymy, and bibliography of recent oviparous Cyprinodontiform fishes*. The killifish master index 4. American Killifish Association.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W. y Knudsen, K.L. (1983). Developmental stability and enzyme heterozygosity in rainbow trout. *Nature*, 301, 71-72.
- Leberg, P.L. (1990). Influence of genetics variability on population growth: implications for conservation. *J. Fish. Biol.*, 37(A), 193-195.
- Leberg, P.L. (1992). Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 46, 477-494.
- Lee, S.C., Chang, J.T. y Tsu, Y.Y. (1995). Genetic relationship of four Taiwan mullets (Pisces: Perciformes: Mugilidae). *J. Fish Biol.*, 46, 159-162.
- Lévène, H. (1949). On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.*, 20, 91-94.
- Lewis, P.O. (2001). Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends Ecol. Evol.*, 16, 30-37.
- Lewontin, R.C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press. New York.
- Linnaeus, C. (1766). *Systema Naturae sive Regna tria Nature, secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Laurentii Salvii, Holmidae*. Ed. 12 vol 1: 532.
- Lugaski, T. 1977 *Fundulus lariversi*, a new Miocene fossil cyprinodont fish from Nevada. *Wasmann Jour. Biol.*, 35, 203-211.
- Lydeard, C., Wooten, M.C. y Meyer, A. (1995). Molecular, morphology, and area cladograms: A cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). *Syst. Biol.*, 44(2), 221-236.
- Mabee, P.M. y Humphries, J. (1993). Coding polymorphic data: Examples from allozymes and ontogeny. *Syst. Biol.*, 42, 166-181.

Bibliografía

- Machordom, A. (1992). *Filogenia y evolución del género Barbus en la península ibérica mediante marcadores moleculares*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Machordom, A., Nicolas, Y. y Crivelli, A. J. (1999). Genetic variability and differentiation in *Leuciscus (Telestes) souffia*. Taxonomic and conservation inferences. *Cr. Acad. Sci. III-Vie*, 322, 15-28.
- Machordom, A. y Doadrio, I. (2001). Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 18, 252-263.
- Maldonado-Koerdell, M. (1964). Geohistory and paleography of Middle-America. En: *Handbook of Middle American Indians. Vol. 1*. R.C. West (Ed.). University of Texas Press. Austin.
- Mallet, J. 1955. A species definition for the Modern Synthesis. *TREE*, 10, 294-300.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27, 209-220.
- Mardulyn, P. y Pasteels, J.M. (1994). Coding allozyme data using step matrices: defining new original states for the ancestral taxa. *Syst. Biol.*, 43, 567-572.
- Marshall, C.J. y Liebherr, J.K. (2000). Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *J. Biogeog.*, 27, 203-216.
- Martin, A.P. y Bermingham, E. (1998). Systematics and evolution of Lower Central American Cichlids inferred from analysis of cytochrome b genes sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2, 192-203.
- Mateos, M., Sanjur, O.I. y Vrijenhoek, R.C. (2002). Historical biogeography of the fish genus *Poeciliopsis* (Cyprinodontiformes). *Evolution*, 56, 985-992.
- Matson, R.H. (1984). Application of electrophoretic data in avian systematics. *Auk*, 101, 717-729.
- Mattern, M.Y. (2004). Molecular phylogeny of the Gasterosteidae: the importance of using multiple genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30, 366-377.

- Mayden, R.L. (1988). Vicariance biogeography parsimony and evolution in North American freshwater fishes. *Syst. Zool.*, 37, 329-355.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origins of Species*. Columbia University Press. New York.
- Meek, S.E. 1902. A Contribution to the Ichthyology of Mexico. *Field Columb. Mus. (Zool. ser)*, 3, 63-129.
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. P.W. Hochachka y T.P. Mommen (Eds.). Elsevier. Amsterdam.
- Meyer, A. y Lydeard, C. (1993). The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentae and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes) inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene X-src. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.*, 254, 153-162.
- Mickevich, M.F. y Johnson, M.S. (1976). Congruence between morphological and allozyme data in evolutionary inference and character evolution. *Syst. Zool.*, 25, 260-270.
- Miller, R.R. (1950). *Profundulus hildebrandi*, a new Cyprinodontid fish from Chiapas, Mexico. *Copeia*, 1950, 22-30.
- Miller, R.R. (1955). A systematic review of the middle American Fishes of the genus *Profundulus*. *Miscellaneous Papers Mus. Zool. Univ. Mich.* 92.
- Mitton, J.B. (1978). Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural populations. *Nature*, 273, 661-662.
- Mitton, J.B. y Hoehn, R.K. (1975). Genetic organization and adaptative response of allozymes to ecological variables in *Fundulus heteroclitus*. *Genetics*, 79, 97-111
- Mójica, C.L. (1998). Comparative ecology and historical biogeography of the genus *Brachyrhaphys*. *Environ. Biol. of Fish.*, 51, 117-127.
- Morizot, D.C. y Siciliano M.J. (1982). Protein polymorphisms, segregation genetic crosses and genetic distances among fishes of the genus *Xiphophorus* (Poeciliidae). *Genetics*, 102, 539-556.

Bibliografía

- Motro, U. y Thomson, G. (1982). On heterozygosity and the effective size of populations subject to size changes. *Evolution*, 36, 1059-1066.
- Murphy, R.W., Sites, J. W., Buth, D.G. y Haufler, C.H. (1990). Proteins I: Isoenzyme electrophoresis. En: *Molecular systematics*. D.M. Hillis and C. Moritz (Eds.). Sinauer Assoc. Inc. Pub. Massachusetts.
- Murphy, W.J. y Collier, G.E. (1996). Phylogenetic relationships within the Aplocheiloid fish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae): Implications for Caribbean and Central American biogeography. *Mol. Biol. Evol.*, 13, 642-649.
- Murphy, W.J. y Collier, G.E. (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): The role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.*, 14, 790-799.
- Murphy, W.J. y Collier, G.E. (1999). Phylogenetic relationships of African killifishes in the genera *Aphyosemion* and *Fundulopanchax* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11, 351-360.
- Myers, G.S. (1938). Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Smithson. Rep.*, 1937, 339-364.
- Naylor, G.J.P., Martin, A.P., Mattison, E.G. y Brown, W.M. (1997). Interrelationships of lamniform sharks: testing phylogenetic hypotheses with sequence data. En: *Molecular Systematics of Fishes*. T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106, 283-292.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nei, M. (1986). Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. En: *Evolutionary Perspectives and the New Genetics*. H. Gershowitz (Ed.). Alan R. Liss. New York.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M. (1991). Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. En: *Phylogenetic Analysis of DNA Sequences*. M.M. Miyamoto y J.L. Cracraft (Eds.). Oxford University Press. New York.

- Nei, M. (1996). Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Genet.*, 30, 371-403.
- Nei, M., Maruyama, T. y Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1-10.
- Nei, M., Tajima, F. y Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.*, 19, 153-170.
- Nevo, E. (1978). Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.*, 13, 121-177.
- Nevo, E. (1988). Genetic diversity in nature. Patterns and theory. *Evol. Biol.*, 23, 217-246.
- Nevo, E., Beiles, A. y Ben-Shlomo, R. (1984). The evolutionary significance of genetic diversity, ecological, demographic and life history correlates. En: *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity*, S. Levin (Ed.). Springer. Berlin.
- Nixon, K.C. y Wheeler, Q.D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6, 211-223.
- Osinov, A.G. y Lebedev, S.V. (2000). Genetic divergence and phylogeny of the Salmoninae based on allozyme data. *J. Fish Biol.*, 57, 354-381.
- Parenti, L.R. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform Fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *B. Am. Mus. Nat. Hist.*, 168, 335-557.
- Parker, A. (1997). Combinig molecular and morphological data in fish systematics: examples from the cyprinodontiformes. En: *Molecular Systematics of Fishes*, T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
- Parker, A. y Kornfield, I. (1995). Molecular perspective on evolution and zoogeography of cyprinodontid killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia*, 1, 8-21.
- Pasteur, G. y Pasteur, N. (1980). Les critères biochimiques et l'espèce animale. En: *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal. Tome III*. Société Zoologique de France. Paris.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J. y Britton-Davidian, J. (1987). *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Collection Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.

- Perdices, A. y Doadrio, I. (2000). Diversification patterns in *Cobitis calderoni* (Osteichthyes: Cobitidae) and relationships with some *Cobitis* lineages. *Folia Zool.*, 49, 45-54.
- Perdices, A., Carmona, J.A., Fernández-Delgado, C. y Doadrio, I. (2001). Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity*, 87, 314-324.
- Perdices, A., Machordom, A. y Doadrio, I. (1995). Allozyme variation of African and Iberian populations of the genus *Cobitis*. *J. Fish Biol.*, 47, 707-718.
- Perdices, A., Machordom, A. y Doadrio, I. (1996). Allozymic variation and relationships of endangered cyprinodontid genus *Valencia* and its implications for conservation. *J. Fish Biol.*, 49, 1112-1127.
- Platnick, N.I. y Nelson, G.N. (1977). A method of analysis for historical biogeography. *Syst. Zool.*, 27, 1-16.
- Posada, D. y Crandall, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Powell, J.R. (1975). Protein variation in natural population of animals. En: *Evolutionary Biology*, Vol. 8. T. Dobzhansky, M.K. Hecht y W.C. Steere (Eds.). Plenum Publishing Corporation. New York.
- Powers, D. A., Ropson, I., Brown D.C., Van Beneden, R., Cashon, R., González-Villaseñor, L.I. y DiMichelle J. (1986). Genetic variation in *Fundulus heteroclitus*: geographic distribution. *Am. Zool.*, 26, 131-144.
- Renno, J.F. (1989). *Génétique des populations et biogéographie de l'ichtyofaune néotropical: Le modèle Leporinus de Guyane*. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc Montpellier II.
- Rivas, L.R. (1986). Comments on Briggs (1984): Freshwater fishes and biogeography of Central America and the Antilles. *Syst. Zool.*, 35, 633-639.
- Rodrigo Álvarez, L. (1994). *Geografía General del Estado de Oaxaca*. Carteles Editores. Oaxaca. México.

- Rogers, J. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distances. En: *Studies in Genetics VII*. University of Texas Publications.
- Rogers, J.S. (1986). Deriving phylogenetic trees from allele frequencies: a comparison of nine genetic distances. *Syst. Zool.*, 35, 297-310.
- Romand, R. (1986). A study of *Aphyosemion schmitti* (Romand, 1979) and a survey of the *Aphyosemion* of Liberia (Pisces, Cyprinodontidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 87, 215-234.
- Ronquist, F. 1996. *DIVA version 1.1*. Computer program and manual available by anonymous FTP from Uppsala University (<ftp.uu.se> o <ftp.sysbot.uu.se>).
- Ronquist, F. (1997). Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Syst. Biol.*, 46, 195-203.
- Rosen, D.E. (1964). The relationships and taxonomic position of the halfbeaks, killifishes, silversides, and their relatives. *B. Am. Mus. Nat. Hist.*, 127, 217-218.
- Rosen, D. E. (1973). Interrelationships of Fishes. Interrelationships of higher euteleosteans fishes. *Zool. J. Linn. Soc-Lond.*, 531, 392-519.
- Rosen, D.E. (1978). Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Syst. Zool.*, 27, 159-188.
- Rosen, D. E. (1979). Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *B. Am. Mus. Nat. Hist.*, 162, 267-375.
- Rosen, D.E. y Bailey, R.M. (1963). The poeciliid fishes (cyprinodontiformes), their structure, zoogeography and systematics. *B. Am. Mus. Nat. Hist.*, 126(1), 1-176.
- Ross, M.I., y Scotesse, C. R. (1988). A hierarchical tectonic model of the Gulf of Mexico and Caribbean region. *Tectonophysics*, 155, 139-168.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-49.
- Saitou, N. y Imanishi, T. (1989). Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.*, 6, 514-525.

- Saitou, N. y Nei, M. (1986). The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to human-chimpanzee-gorilla divergence. *J. Mol. Evol.*, 24, 189-204.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M. y von Haeseler, A. (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*, 18, 502-504.
- Schneider, S., Kueffer, J.M., Roesli, D. y Whitt, G.S. (1997). *Arlequin ver 1.1: a software for population genetic data analysis*. Genetic and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Scholl, A., Corzilius, B. y Villwock, W. (1978). Beitrag zur Verwandtschaftsanalyse altweltlicher Zahnkarpfen der Tribus Aphaniini (Pisces, Cyprinodontidae) mit Hilfe elektrophoretischer Untersuchungsmethoden. *Z. Zool. Syst. Evol.*, 16, 116-132.
- Schönhuth, S. (2002). *Sistemática, filogenia e implicaciones biogeográficas de las poblaciones del género Notropis Rafinesque, 1817 (Actinopterygii: Cyprinidae) en el Centro y Sur de México*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Schug, M.D., Jerry F., Downhower, J.F., Brown L.P., Sears, D.B. y Fuerst, P.A. (1998). Isolation and genetic diversity of *Gambusia hubbsi* (mosquitofish) populations in blueholes on Andros Island, Bahamas. *Heredity*, 80, 336-346.
- Semerikov, V.L., Semerikov, L.F. y Lascoux, M. (1999). Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species. *Heredity*, 82, 193-204.
- Sethi, R.P. (1960). *Osteology and phylogeny of oviparous cyprinodont fishes (order Cyprinodontiformes)*. Ph. D. dissertation. University of Florida.
- Shaklee, J.B., Allendorf, F.W., Morizot, D.C. y Whitt, G.S. (1990). Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *T. Am. Fish. Soc.*, 119, 2-15.
- Shaw, P.W., Carvalho, G.R., Magurran A.E. y Seghers, B.H. (1994). Factors affecting the distribution of genetic variability in the guppy, *Poecilia reticulata*. *J Fish Biol.*, 45, 875-888.

-
- Sivasundar, A., Bermingham, E. y Ortí, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.*, 10, 407-418.
 - Smith, P.J. y Fuijo, Y. (1982). Genetic variation in marine teleosts: high variability in specialists and low variability in habitat generalists. *Mar. Biol.*, 69, 7-20.
 - Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39, 53-65.
 - Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
 - Sober, E. (1988). The conceptual relationship of cladistic phylogenetics and vicariance biogeography. *Syst. Zool.*, 37, 245-253.
 - Soulé, M.E. (1980). Variación aloenzimática: sus determinantes en el espacio y en el tiempo. En: *Evolución Molecular*. F. J. Ayala (Ed.). Omega. Barcelona.
 - Soulé, M.E. (1986). Patterns of diversity and rarity. En: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. M.E. Soulé (Ed.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachussets.
 - Sourdis, J. y Krimbas, C. (1987). Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 159-166.
 - Sourdis, J. y Nei, M. (1988) Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, 5, 298-311.
 - StatSoft, Inc. (1995). *STATISTICA for Windows. Computer program manual*. Tulsa, Oklahoma.
 - Stepien, C.A. y Kocher, T.D. (1997). Molecules and morphology in studies of fish evolution. En: *Molecular Systematics of Fishes*. T.D. Kocher y C.A. Stepien (Eds.). Academic Press. New York.
 - Sullivan, J., Arellano, E.A., y Rogers, D.S. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: Concerted versus independent responses to past climatic fluctuations. *Am. Nat.*, 155, 755-768.
-

- Swofford, D.L. (1998). *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, v. 4.0. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachussetts.
- Swofford, D.L. y Berlocher, S.H. (1987). Inferring evolutionary trees from gene frequency data under the principle of maximum parsimony. *Syst. Zool.*, 36, 293- 325.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Wadedell, P. J. y Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference. En: *Molecular Systematics*. D.M. Hillis, C. Moritz y B.K. Mable (Eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachussetts.
- Swofford, D.L., Selander, R.B. y Black, W.C. (1997). *Biosys-2: A computer program for the analysis of allelic variation in genetics*. Departament of Genetic and Development, University of Illinois at Urbana-Champaign. Department of Microbiology, Colorado State University.
- Takezaki, N., Rzhetsky, A. y Nei, M. (1995). Phylogenetic tests of molecular clock and linearized trees. *Mol. Evol. Biol.*, 12, 823-833.
- Tateno, Y., Nei, M. y Tajima, F. (1982). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. *J. Mol. Evol.*, 1, 387- 404.
- Templeton, A.R. (1989). The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: *Speciation and its consequences*. D. Otte y J.A. Endler (Eds.). Sinauer Associates, Sunderland Massachussetts.
- Templeton, A.R. (1994). The role of molecular genetics in speciation studies. En: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. B. Schierwater, B. Streit, G. Wagner y R. DeSalle (Eds.). Birkhäuser-Verlag. Basel.
- Thorpe, J.P. (1982). The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13, 139 - 168.
- Thorpe, J.P. (1984). Primary and secondary transition zones in speciation and population differentiation: a phylogenetic analysis of range expansion. *Evolution*, 38, 233-243.
- Togan, I., Fidan, A. Z., Yain, E., Ergüven, A. y Emre, Y. (1995). Genetic structure of Turkish brown trout populations. *J. Fish Biol.*, 47 (Supl. A), 164-169.
- Turner, B.J.(1983). Genic variation and differentiation of remnant natural populations of the desert pupfish, *Cyprinodon macularius*. *Evolution*, 37(4), 690-700.

- Uyeno, T. y Miller, R.R. (1962). Relationships of *Empetrichthys erdisi*, a Pliocene cyprinodontid fish from California with remarks on the Funduline and Cyprinodontinae. *Copeia*, 3, 520-532.
- Vargas, J.M. (1991). Escuelas y tendencias en Biogeografía histórica. *Rev. Esp. Herp.*, (1991), 107-136.
- Vawter, L. y Brown, W.M. (1986). Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 234, 194-196.
- Vig, E., Gabrielak, T., Leyko, W., Nemcsok, J. y Matkovics, B. (1989). Purification and characterization of Cu,Zn-superoxide dismutase from common carp liver. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 94, 395-397.
- Villwock, W. (1982). *Aphanius* (Nardo, 1827) and *Cyprinodon* (Lac., 1803) (Pisces: Cyprinodontidae) an attempt for a genetic interpretation of speciation. *Z. Zool. Syst. Evol.*, 20, 187-197.
- Vrijenhoek, R.C. (1979). Genetics of sexually reproducing fish in a highly fluctuating environment. *Am. Nat.*, 113, 17-29.
- Vrijenhoek, R.C., Angus, R. A., y Schultz, R. J. (1977). Variation and heterozygosity in sexually and clonally reproducing populations. *Evolution*, 31, 767-781.
- Vrijenhoek, R.C., Douglas, M.E. y Meffe, G.K. (1985). Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science*, 229, 400-402.
- Wallace, D.C. (1986). Mitochondrial genes and disease. *Hosp. Pract.*, 21, 77-92.
- Ward, R.D., Woodward, M. y Skibinski, D.O.F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.*, 44, 213-232.
- Wilson, G.M., Thomas, W.K. y Beckenbach, A.T. (1987). Mitochondrial DNA analysis of Pacific Northwest populations of *Onchorhynchus tshawytscha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 1301-1305.
- Wishard, L.N., Seeb, J.E., Utter, F.M. y Stefan, D. (1984). A genetic investigation of suspected redband trout populations. *Copeia*, 1984, 120-132.
- Whittemore, A.T. (1993). Species Concepts: A Reply to Ernst Mayr. *Taxon*, 42, 573-583.

- Wooten, M.C., Scribner, K.T. y Smith, H.S. (1988). Genetic variability and systematics of *Gambusia* in the Southeastern United States. *Copeia*, 1988, 283-289.
- Wright, S. (1931). Evolution in mammalian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395-420.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4: Variability within and between populations*. University of Chicago Press. Chicago.
- Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A. y Wallimann, T. (1985). Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochem. Bioph. Acta*, 1102, 119-166.
- Yang, Z. (1996). Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *J. Mol. Evol.*, 42, 587-596.
- Yang, Z. y Rannala, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Mol. Biol. Evol.*, 14, 717-724.
- Zardoya, R. (1994). *El Genoma Mitocondrial de la Trucha Arco Iris, Oncorhynchus mykiss*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Zhu, D., Jamieson, B.G.M., Hugall, A. y Moritz, C. (1994). Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (Melanotaeniidae). *Mol. Biol. Evol.*, 11, 672-683.
- Zuckerkandl, E. y Pauling, I. (1962). Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. En *Horizons in Biochemistry*. M. Kasha y B. Pullman (Eds.). Academic Press. New York.
- Zuckerkandl, E. y Pauling, I. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. En *Evolving Genes and Proteins*. V. Bryson y H.J. Vogel (Eds.). Academic Press. New York.

Anexo 1: Frecuencias alélicas de las poblaciones de *Profundulus*. (N) es el número de individuos por población que expresan un determinado sistema enzimático.

	Gua	Pol	Bra	Tol	Nov	Cha	Coy	Teh1	Teh2	Col1	Col2	Man	Ato1	Ato2	Ato3	Ato4	Ato5
AAT-1																	
(N)	19	12	20	20	14	15	10	4	20	25	22	4	36	5	10	10	10
100				0,025						0,200	0,591	0,250	0,972				
70																	
80																	
87																	
90												0,125		1,000	1,000		
93									0,650								
95	1,000	1,000	1,000	0,975	1,000	1,000	1,000	1,000	0,350	0,800	0,409	0,625	0,028			1,000	1,000
105																	
110																	
AAT-2																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	25	22	4	35	5	9	9	10
50	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000		0,020			0,029	0,200	0,667	1,000	1,000
60									1,000								
62																	
80							0,850			0,420	0,705	0,500	0,957	0,800	0,333		
90							0,150			0,560	0,295	0,500	0,014				
97																	
AAT-3																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	3	20	23	22	4	36	5	9	10	10
100																	
103																	
105					0,214	0,067	0,100			0,913	1,000		0,056				
110	1,000	1,000	1,000	1,000	0,786	0,933	0,900	1,000	1,000	0,087		1,000	0,944	0,200	1,000	1,000	1,000
120														0,800			
AK																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	25	21	4	38	5	10	10	10
100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,200	1,000
102																	
105																	
110																0,800	
CK																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	26	22	4	38	5	10	10	10
100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
80																	
95																1,000	1,000
97																	
105																	
EST-1																	
(N)	11	13	11	20	12	15	10	4	20	26	22	4	38	5	10	10	10
100	1,000	0,923	1,000	1,000	0,667	0,067	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,961			1,000	1,000
80									0,025								
90						0,300			0,500					1,000	1,000		
95					0,333	0,633			0,475				0,013				
98													0,026				
105		0,077															
110																	
115																	
EST-2																	
(N)	17	13	20	20	14	15	9	3	19	26	22	4	37	5	10	10	10
100	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,973	0,500	0,450	1,000	1,000
80													0,014				
90													0,014	0,500	0,550		
95																	
110																	
120																	

Anexos

	Ato6	Ato7	Ato8	Pic	Que	Mix1	Mix2	Pap1	Pap2	Gri	Jer	Sel	Vir	Com	Gran	Nen	Chi	Leb
AAT-1																		
(N)	10	13	10	13	14	5	7	19	9	9	20	18	14	16	19	22	17	21
100													0,143				0,618	
70							0,071											
80			0,100															
87				0,885		1,000		1,000										0,857
90													0,607					
93																		
95	1,000	1,000	0,900	0,115	1,000		0,929		1,000	1,000							0,029	0,143
105											1,000	1,000	0,179	1,000	1,000	1,000		
110													0,071				0,353	
AAT-2																		
(N)	10	13	9	13	14	5	7	19	9	10	20	15	10	10	19	13	7	19
50	1,000	1,000	1,000		0,429	0,600	1,000	0,711	0,889	1,000	1,000	1,000			1,000	1,000		
60																		
62																		0,921
80				1,000	0,536	0,400		0,289	0,111									
90					0,036													
97													1,000	1,000			1,000	0,079
AAT-3																		
(N)	10	12	10	13	15	5	7	19	9	10	20	18	15	14	19	22	5	21
100											0,050			0,071				1,000
103											0,950	1,000	1,000	0,929	1,000	1,000	1,000	
105			0,200	1,000	1,000			1,000	1,000									
110	1,000	1,000	0,800				1,000			1,000								
120						1,000												
AK																		
(N)	11	12	10	13	15	5	7	19	9	10	20	18	15	16	19	22	16	21
100	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	0,789	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
102								0,105										
105			0,050					0,105										
110																		
CK																		
(N)	11	12	10	11	14	5	7	19	9	10	20	18	15	16	19	22	19	21
100		0,083	0,050	0,727	1,000	1,000		0,789	1,000	0,800			1,000			0,136	1,000	
80																		0,976
95	1,000	0,917	0,950	0,273			1,000	0,211		0,200								0,024
97											1,000	1,000		1,000				
105															1,000	0,864		
EST-1																		
(N)	11	13	10	13	13	5	7	19	9	10	20	18	15	12	18	22	12	20
100	1,000	1,000	1,000	1,000	0,538		1,000	1,000	1,000							0,114		
80																		
90						1,000				1,000						0,045		
95																		
98																		
105											1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,841	1,000	
110					0,462													
115																		1
EST-2																		
(N)	11	13	10	13	11	5	7	18	9	9	20	18	15	14	19	22	12	20
100	1,000	0,923	1,000	1,000	0,727	1,000	0,286	1,000	1,000	1,000			1,000				1,000	
80																		
90		0,077			0,091		0,714				0,125							
95											0,875	1,000		1,000	1,000	1,000		
110					0,182													
120																		1,000

	Gua	Pol	Bra	Tol	Nov	Cha	Coy	Teh1	Teh2	Col1	Col2	Man	Ato1	Ato2	Ato3	Ato4	Ato5
<i>FUM</i>																	
(N)	18	13	20	20	14	15	10	4	20	5	22	3	30	4	9	9	10
100	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	0,833	1,000	1,000		1,000	0,386	1,000	0,283		0,111	1,000	0,500
60																	
90				0,500		0,067			1,000		0,591		0,700	1,000	0,889		0,500
95						0,067							0,017				
107						0,033					0,023						
115																	
130																	
<i>IDH-1</i>																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	26	22	4	37	5	10	10	10
100																	
89																	
90	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
95																	
<i>IDH-2</i>																	
(N)	19	12	17	19	14	12	10	4	20	7	22	4	28	5	9	6	10
100	1,000		0,559	0,947	0,143		0,800	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
70																0,167	0,550
74																	
75				0,053													
80			0,088		0,857	1,000	0,100	0,250								0,833	0,400
81																	
90			0,118				0,100										
105		1,000	0,235														
108																	
110								0,250									
118																	
120																	
0																	0,050
<i>LDH-1</i>																	
(N)	19	12	20	20	14	15	10	4	19	9	12	4	33	5	4	5	10
100										0,111	0,083				0,250		
5																	
10	1,000	1,000															
50																1,000	1,000
95			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,750	1,000	0,889	0,917	1,000	1,000	1,000	0,750		
112								0,250									
<i>LDH-2</i>																	
(N)	19	4	18	19	14	15	10	3	18	24	15	4	37	5	10	10	10
100		1,000	0,750	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,900	1,000	0,900	1,000
70																	
80																	
90																	
101														0,100		0,100	
102																	
105			0,250														
130	1,000																
<i>MDH-1</i>																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	26	22	4	37	5	10	10	10
100													0,027				
70	1,000		0,975	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,865	1,000	1,000	1,000	1,000
80		1,000	0,025										0,108				
<i>MDH-2</i>																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	26	22	4	38	5	9	10	10
130	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
100																	
132																	
137																	
140																	

Anexos

	Ato6	Ato7	Ato8	Pic	Que	Mix1	Mix2	Pap1	Pap2	Gri	Jer	Sel	Vir	Com	Gran	Nen	Chi	Leb
FUM																		
(N)	10	10	10	12	7	5	7	16	9	10	20	18	15	16	18	22	20	21
100	0,700	0,900	1,000		0,143	0,400	1,000	1,000	1,000	0,100							0,050	1,000
60																		
90	0,300	0,100		1,000	0,857	0,600				0,900								
95																		
107														0,031				
115											1,000	1,000	1,000	0,969	1,000	0,773	0,950	
130																0,227		
IDH-1																		
(N)	10	11	10	13	14	5	7	19	9	10	20	18	15	16	19	22	20	21
100			0,100															1,000
89																		
90	1,000	1,000	0,900	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
95											1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
IDH-2																		
(N)	11	9	10	11	14	5	7	19	9	10	20	2	15	16	17	22	20	20
100		0,222	0,400	1,000	0,929	1,000		1,000	0,944	0,000			1,000	0,125			0,225	
70	0,727	0,722	0,250				1,000											
74																		0,425
75									0,056	1,000								
80	0,273	0,056	0,350		0,071													
81																		0,575
90																	0,750	
105											0,075			0,406	0,382	0,136	0,025	
108												1,000						
110																		
118											0,900			0,469	0,618	0,864		
120											0,025							
0																		
LDH-1																		
(N)	7	12	10	10	11	5	7	16	9	9	20	18	12	16	18	22	17	7
100								0,063	0,222									0,857
5																0,045		
10											1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	0,955	0,824	
50	1,000	1,000	1,000				1,000								0,056		0,176	
95				1,000	1,000	1,000		0,938	0,778	1,000								
112																		
LDH-2																		
(N)	9	12	10	12	15	5	7	19	9	9	20	18	15	16	19	19	20	6
100	0,778		0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	0,579	1,000	1,000								
70		0,792																
80		0,042						0,026										
90	0,111	0,167																
101	0,111																	
102								0,395										1,000
105			0,050													0,184		
130											1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,816	1,000	
MDH-1																		
(N)	11	13	10	13	15	5	7	19	9	10	20	15	15	15	19	22	20	19
100											0,725	0,833	1,000	0,967	1,000	0,909	1,000	
70	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000								
80			0,050								0,275	0,167		0,033		0,091		1,000
MDH-2																		
(N)	11	13	10	13	13	5	7	19	9	10	20	18	15	12	19	22	20	21
130	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,900	0,917	1,000	1,000	0,974	1,000	1,000	
100												0,083						
132															0,026			
137																		1,000
140			0,050															

	Gua	Pol	Bra	Tol	Nov	Cha	Coy	Teh1	Teh2	Col1	Col2	Man	Ato1	Ato2	Ato3	Ato4	Ato5
ME																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	25	22	4	37	5	10	10	10
100		0,077															
85												0,500	0,027				
90	1,000	0,923	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,973	1,000	1,000	1,000	1,000
95																	
105																	
MPI																	
(N)	19	11	20	20	13	15	9	3	20	25	21	4	33	5	10	10	10
100													0,030			1,000	1,000
80													0,030				
83																	
85							0,889			1,000	0,810	1,000	0,606	1,000	1,000		
87	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,111	1,000	1,000		0,190		0,333				
90																	
105																	
6PGD																	
(N)	19	13	20	19	14	15	10	4	20	17	18	4	38	5	10	10	10
100	0,158	1,000	0,925	0,474	1,000	0,800	0,900	0,750	1,000	0,941	0,944	0,750	0,605	1,000	0,900	1,000	1,000
95																	
102	0,842		0,075	0,526		0,200	0,100	0,250		0,059	0,056	0,250	0,395		0,100		
104																	
PGI-1																	
(N)	19	13	20	20	14	15	10	4	20	26	22	4	38	5	10	10	10
100	0,605	1,000	1,000	1,000	0,679	1,000		0,875	1,000	1,000	1,000	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000
50																	
53																	
70					0,071								0,053				
120					0,250			0,125									
125	0,395																
130							1,000										
140																	
PGI-2																	
(N)	19	13	20	20	12	15	10	4	20	25	16	4	37	5	10	10	10
100	1,000	1,000				1,000			0,800						0,100	1,000	1,000
70																	
85								0,125	0,050					1,000	0,900		
90																	
110								0,050									
115																	
130			0,650	1,000	1,000			0,875	0,100			1,000					
135			0,075				1,000			0,660	1,000		1,000				
140			0,275							0,340							
PGM																	
(N)	19	11	20	15	14	15	10	4	20	21	22	4	35	5	10	10	10
97	0,868	1,000	0,975	0,700	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,952	1,000	1,000	0,929			1,000	1,000
90	0,132																
93			0,025														
95										0,048				1,000	1,000		
98				0,300									0,071				
SOD																	
(N)	19	13	20	20	13	15	10	4	20	26	22	4	38	5	8	10	10
100	1,000	1,000	0,850	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			0,900	0,400
10																	
20																	
90																	
92							0,050										
94														1,000	1,000		
96																	
102			0,150				0,900									0,100	0,600
105																	
108							0,050										
115																	

Anexos

	Ato6	Ato7	Ato8	Pic	Que	Mix1	Mix2	Pap1	Pap2	Gri	Jer	Sel	Vir	Com	Gran	Nen	Chi	Leb
ME																		
(N)	10	13	10	13	15	5	7	19	9	10	19	1	2	13	19	4	18	15
100		0,462										1,000	0,250	0,846	1,000	0,125	0,889	1,000
85																		
90	1,000	0,538	1,000	1,000	0,933	0,900	0,857	1,000	1,000	1,000	0,158		0,500				0,111	
95					0,067	0,100	0,143											
105											0,842		0,250	0,154		0,875		
MPI																		
(N)	6	11	10	13	15	5	7	19	9	9	20	16	15	16	19	22	18	20
100	0,833	1,000	1,000				1,000			0,111	1,000	1,000		0,750	1,000	0,864		0,400
80																		
83													0,733					
85						1,000				0,222								
87	0,167			1,000	1,000			1,000	1,000	0,667								
90													0,267	0,250		0,136	1,000	
105																		0,600
6PGD																		
(N)	11	13	10	13	14	5	7	18	9	10	20	18	15	16	19	22	20	16
100	1,000	1,000	0,850	1,000	0,857	0,600	1,000	0,944	1,000		0,900	1,000		0,938	0,895	1,000		
95			0,150											0,063				
102					0,143	0,400		0,056		1,000	0,100		0,900		0,105			
104													0,100				1,000	1,000
PGI-1																		
(N)	11	13	10	13	15	5	7	19	9	10	20	18	15	16	19	22	19	21
100	1,000	1,000	0,750	0,962	0,700	1,000	0,643			1,000	1,000	1,000	0,733	1,000	1,000	1,000	0,158	
50			0,250				0,357											
53																		1,000
70																		
120																		
125																		
130				0,038	0,300			1,000	0,778				0,267				0,842	
140									0,222									
PGI-2																		
(N)	11	13	10	13	15	5	7	19	8	10	20	18	15	16	19	22	20	21
100	1,000	1,000	0,150				1,000				0,050		1,000		0,079		0,950	0,762
70			0,050															
85			0,350			1,000												
90			0,050															
110																		
115																	0,025	0,238
130			0,400	1,000	1,000					1,000	0,950	0,944		1,000	0,921	1,000	0,025	
135								1,000	0,875			0,056						
140									0,125									
PGM																		
(N)	11	13	10	13	15	5	7	18	9	10	20	16	15	15	19	22	20	21
97	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,889	1,000	1,000			0,867				1,000	
90																		
93											1,000	1,000		1,000	1,000	1,000		
95						1,000		0,111										
98													0,133					1,000
SOD																		
(N)	11	13	10	12	11	5	7	19	9	10	20	12	15	16	19	22	20	15
100	0,636	0,077	0,750	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000		0,083						
10			0,100								0,225	0,458		0,469	0,816	0,614		
20			0,050															
90														0,031				
92														0,031				
94						1,000												
96											0,775	0,458		0,313	0,184	0,386		
102	0,364	0,923	0,100															
105														0,156				
108																		1,000
115													1,000				1,000	

Anexo 2: Alelos marcadores (M), exclusivos (E) y raros (R) en las poblaciones de *Profundulus*.

	AAT-1-100*	AAT-1-70*	AAT-1-80*	AAT-1-87*	AAT-1-90*	AAT-1-93*	AAT-1-95*	AAT-1-105*	AAT-1-110*
Gua							M		
Pol							M		
Bra							M		
Tol	R						E		
Nov							M		
Cha							M		
Coy							M		
Teh1							M		
Teh2						E	E		
Col1	E						E		
Col2	E						E		
Man	E				E		E		
Ato1	E						R		
Ato2				M					
Ato3				M					
Ato4							M		
Ato5							M		
Ato6							M		
Ato7							M		
Ato8			E				E		
Pic				E			E		
Que							M		
Mix1				M					
Mix2		E					E		
Pap1				M					
Pap2							M		
Gri							M		
Jer								M	
Sel								M	
Vir	E				E			E	E
Com								M	
Gra								M	
Nen								M	
Chi	E						R		E
Leb									

Anexos

	AAT-2-50*	AAT-2-60*	AAT-2-62*	AAT-2-80*	AAT-2-90*	AAT-2-97*	AAT-3-100*	AAT-3-103*	AAT-3-105*	AAT-3-110*	AAT-3-120*
Gua	M									M	
Pol	M									M	
Bra	M									M	
Tol	M									M	
Nov	M								E	E	
Cha	M								E	E	
Coy				E	E				E	E	
Teh1	M									M	
Teh2		M								M	
Col1	R			E	E				E	E	
Col2				E	E				M		
Man				E	E					M	
Ato1	R			E	R				E	E	
Ato2	E			E						E	E
Ato3	E			E						M	
Ato4	M									M	
Ato5	M									M	
Ato6	M									M	
Ato7	M									M	
Ato8	M								E	E	
Pic				M					M		
Que	E			E	R				M		
Mix1	E			E							M
Mix2	M									M	
Pap1	E			E					M		
Pap2	E			E					M		
Gri	M									M	
Jer	M						R				
Sei	M							E			
Vir						M		M			
Com						M	E	E			
Gra	M							M			
Nen	M							M			
Chi						M					
Leb			E			E	M				

	AK-100*	AK-102*	AK-105*	AK-110*	CK-100*	CK-80*	CK-95*	CK-97*	CK-105*
Gua	M				M				
Pol	M				M				
Bra	M				M				
Tol	M				M				
Nov	M				M				
Cha	M				M				
Coy	M				M				
Teh1	M				M				
Teh2	M				M				
Col1	M				M				
Col2	M				M				
Man	M				M				
Ato1	M				M				
Ato2	M				M				
Ato3	M				M				
Ato4	E			E			M		
Ato5	M						M		
Ato6	M						M		
Ato7	M				E		E		
Ato8	E		R		R		E		
Pic	M				E		E		
Que	M				M				
Mix1	M				M				
Mix2	M						M		
Pap1	E	E	E		E		E		
Pap2	M				M				
Gri	M				E		E		
Jer	M							M	
Sel	M							M	
Vir	M				M				
Com	M							M	
Gra	M								M
Nen	M				E				E
Chi	M				M				
Leb	M					E	R		

Anexos

		EST-1-100*	EST-1-80*	EST-1-90*	EST-1-95*	EST-1-98*	EST-1-105*	EST-1-110*	EST-1-115*
Gua	M								
Pol	E						E		
Bra	M								
Tol	M								
Nov	E				E				
Cha	E			E	E				
Coy	M								
Teh1	M								
Teh2			R	E	E				
Col1	M								
Col2	M								
Man	M								
Ato1	E				R	R			
Ato2				M					
Ato3				M					
Ato4	M								
Ato5	M								
Ato6	M								
Ato7	M								
Ato8	M								
Pic	M								
Que	E							E	
Mix1				M					
Mix2	M								
Pap1	M								
Pap2	M								
Gri				M					
Jer							M		
Sel							M		
Vir							M		
Com							M		
Gra							M		
Nen	E			R			E		
Chi							M		
Leb									M

	EST-2-100*	EST-2-80*	EST-2-90*	EST-2-95*	EST-2-110*	EST-2-10*
Gua	M					
Pol	M					
Bra	M					
Tol	M					
Nov	M					
Cha	M					
Coy	M					
Teh1	M					
Teh2	M					
Col1	M					
Col2	M					
Man	M					
Ato1	E	R	R			
Ato2	E		E			
Ato3	E		E			
Ato4	M					
Ato5	M					
Ato6	M					
Ato7	E		E			
Ato8	M					
Pic	M					
Que	E		E		E	
Mix1	M					
Mix2	E		E			
Pap1	M					
Pap2	M					
Gri	M					
Jer			E	E		
Sel				M		
Vir	M					
Com				M		
Gra				M		
Nen				M		
Chi	M					
Leb						M

	<i>FUM-100*</i>	<i>FUM-60*</i>	<i>FUM-90*</i>	<i>FUM-95*</i>	<i>FUM-107*</i>	<i>FUM-115*</i>	<i>FUM-130*</i>
Gua	M						
Pol	M						
Bra	M						
Tol	E		E				
Nov	M						
Cha	E		E	E	R		
Coy	M						
Teh1	M						
Teh2			M				
Col1	M						
Col2	E		E		R		
Man	M						
Ato1	E		E	R			
Ato2			M				
Ato3	E		E				
Ato4	M						
Ato5	E		E				
Ato6	E		E				
Ato7	E		E				
Ato8	M						
Pic			M				
Que	E		E				
Mix1	E		E				
Mix2	M						
Pap1	M						
Pap2	M						
Gri	E		E				
Jer						M	
Sel						M	
Vir						M	
Com					R	E	
Gra						M	
Nen						E	
Chi	R					E	E
Leb		M					

	IDH-1-100*	IDH-1-89*	IDH-1-90*	IDH-1-95*	IDH-2-100*	IDH-2-70*	IDH-2-74*	IDH-2-75*
Gua			M		M			
Pol			M					
Bra			M		E			
Tol			M		E			E
Nov			M		E			
Cha			M					
Coy			M		E			
Teh1			M		E			
Teh2			M		M			
Col1			M		M			
Col2			M		M			
Man			M		M			
Ato1			M		M			
Ato2			M		M			
Ato3			M		M			
Ato4			M			E		
Ato5			M			E		
Ato6			M			E		
Ato7			M		E	E		
Ato8		E	E		E	E		
Pic			M		M			
Que			M		E			
Mix1			M		M			
Mix2			M			M		
Pap1			M		M			
Pap2			M		E			E
Gri			M					M
Jer				M				
Sel				M				
Vir				M	M			
Com				M	E			
Gra				M				
Nen				M				
Chi				M	E			
Leb	M						E	

Anexos

	IDH-2-80*	IDH-2-81*	IDH-2-90*	IDH-2-105*	IDH-2-108*	IDH-2-110*	IDH-2-118*	IDH-2-120*	IDH-2-0*
Gua									
Pol				M					
Bra	E		E	E					
Tol									
Nov	E								
Cha	M								
Coy	E		E						
Teh1	E					E			
Teh2									
Col1									
Col2									
Man									
Ato1									
Ato2									
Ato3									
Ato4	E								
Ato5	E								R
Ato6	E								
Ato7	E								
Ato8	E								
Pic									
Que	E								
Mix1									
Mix2									
Pap1									
Pap2									
Gri									
Jer				E			E	R	
Sel					M				
Vir									
Com				E			E		
Gra				E			E		
Nen				E			E		
Chi			E	R					
Leb		E							

	LDH-1-100*	LDH-1-5*	LDH-1-10*	LDH-1-50*	LDH-1-95*	LDH-1-112*
Gua			M			
Pol			M			
Bra					M	
Tol					M	
Nov					M	
Cha					M	
Coy					M	
Teh1					E	E
Teh2					M	
Col1	E				E	
Col2	E				E	
Man					M	
Ato1					M	
Ato2					M	
Ato3	E				E	
Ato4				M		
Ato5				M		
Ato6				M		
Ato7				M		
Ato8				M		
Pic					M	
Que					M	
Mix1					M	
Mix2				M		
Pap1	E				E	
Pap2	E				E	
Gri					M	
Jer			M			
Sel			M			
Vir			M			
Com			M			
Gra			E	E		
Nen		R	E			
Chi			E	E		
Leb	E			E		

Anexos

	LDH-2-100*	LDH-2-70*	LDH-2-80*	LDH-2-90*	LDH-2-101*	LDH-2-102*	LDH-2-105*	LDH-2-130*
Gua								M
Pol	M							
Bra	E						E	
Tol	M							
Nov	M							
Cha	M							
Coy	M							
Teh1	M							
Teh2	M							
Col1	M							
Col2	M							
Man	M							
Ato1	M							
Ato2	E				E			
Ato3	M							
Ato4	E				E			
Ato5	M							
Ato6	E			E	E			
Ato7		E	R	E				
Ato8	E						R	
Pic	M							
Que	M							
Mix1	M							
Mix2	M							
Pap1	E		R			E		
Pap2	M							
Gri	M							
Jer								M
Sel								M
Vir								M
Com								M
Gra								M
Nen							E	E
Chi								M
Leb						M		

	MDH-1-100*	MDH-1-70*	MDH-1-80*	MDH-2-130*	MDH-2-100*	MDH-2-132*	MDH-2-137*	MDH-2-140*
Gua		M		M				
Pol			M	M				
Bra		E	R	M				
Tol		M		M				
Nov		M		M				
Cha		M		M				
Coy		M		M				
Teh1		M		M				
Teh2		M		M				
Col1		M		M				
Col2		M		M				
Man		M		M				
Ato1	R	E	E	M				
Ato2		M		M				
Ato3		M		M				
Ato4		M		M				
Ato5		M		M				
Ato6		M		M				
Ato7		M		M				
Ato8		E	R	E				R
Pic		M		M				
Que		M		M				
Mix1		M		M				
Mix2		M		M				
Pap1		M		M				
Pap2		M		M				
Gri		M		M				
Jer	E		E	E				E
Sel	E		E	E	E			
Vir	M			M				
Com	E		R	M				
Gra	M			E		R		
Nen	E		E	M				
Chi	M			M				
Leb			M				M	

	ME-100*	ME-85*	ME-90*	ME-95*	ME-105*
Gua			M		
Pol	E		E		
Bra			M		
Tol			M		
Nov			M		
Cha			M		
Coy			M		
Teh1			M		
Teh2			M		
Col1			M		
Col2			M		
Man		E	E		
Ato1		R	E		
Ato2			M		
Ato3			M		
Ato4			M		
Ato5			M		
Ato6			M		
Ato7	E		E		
Ato8			M		
Pic			M		
Que			E	E	
Mix1			E	E	
Mix2			E	E	
Pap1			M		
Pap2			M		
Gri			M		
Jer			E		E
Sel	M				
Vir	E		E		E
Com	E				E
Gra	M				
Nen	E				E
Chi	E		E		
Leb	M				

	MPI-100*	MPI-80*	MPI-83*	MPI-85*	MPI-87*	MPI-90*	MPI-105*
Gua					M		
Pol					M		
Bra					M		
Tol					M		
Nov					M		
Cha					M		
Coy				E	E		
Teh1					M		
Teh2					M		
Col1				M			
Col2				E	E		
Man				M			
Ato1	R	R		E	E		
Ato2				M			
Ato3				M			
Ato4	M						
Ato5	M						
Ato6	E				E		
Ato7	M						
Ato8	M						
Pic					M		
Que					M		
Mix1				M			
Mix2	M						
Pap1					M		
Pap2					M		
Gri	E			E	E		
Jer	M						
Sel	M						
Vir			E			E	
Com	E					E	
Gra	M						
Nen	E					E	
Chi						M	
Leb	E						E

	6PGD-100*	6PGD-95*	6PGD-102*	6PGD-104*
Gua	E		E	
Pol	M			
Bra	E		E	
Tol	E		E	
Nov	M			
Cha	E		E	
Coy	E		E	
Teh1	E		E	
Teh2	M			
Col1	E		E	
Col2	E		E	
Man	E		E	
Ato1	E		E	
Ato2	M			
Ato3	E		E	
Ato4	M			
Ato5	M			
Ato6	M			
Ato7	M			
Ato8	E	E		
Pic	M			
Que	E		E	
Mix1	E		E	
Mix2	M			
Pap1	E		E	
Pap2	M			
Gri			M	
Jer	E		E	
Sel	M			
Vir			E	E
Com	E	E		
Gra	E		E	
Nen	M			
Chi				M
Leb				M

	PGI-1-100*	PGI-1-50*	PGI-1-53*	PGI-1-70*	PGI-1-120*	PGI-1-125*	PGI-1-130*	PGI-1-140*
Gua	E					E		
Pol	M							
Bra	M							
Tol	M							
Nov	E			E	E			
Cha	M							
Coy							M	
Teh1	E				E			
Teh2	M							
Col1	M							
Col2	M							
Man	M							
Ato1	E							
Ato2	M							
Ato3	M							
Ato4	M							
Ato5	M							
Ato6	M							
Ato7	M							
Ato8	E	E						
Pic	E						R	
Que	E						E	
Mix1	M							
Mix2	E	E						
Pap1							M	
Pap2							E	E
Gri	M							
Jer	M							
Sel	M							
Vir	E						E	
Com	M							
Gra	M							
Nen	M							
Chi	E						E	
Leb			M					

Anexos

	PGI-2-100*	PGI-2-70*	PGI-2-85*	PGI-2-90*	PGI-2-110*	PGI-2-115*	PGI-2-130*	PGI-2-135*	PGI-2-140*
Gua	M								
Poi	M								
Bra							E		E
Tol							M		
Nov							M		
Cha	M								
Coy								M	
Teh1			E				E		
Teh2	E		R		R		E		
Col1								E	E
Col2								M	
Man							M		
Ato1								M	
Ato2			M						
Ato3	E		E						
Ato4	M								
Ato5	M								
Ato6	M								
Ato7	M								
Ato8	E	R	E	R			E		
Pic							M		
Que							M		
Mix1			M						
Mix2	M								
Pap1								M	
Pap2								E	E
Gri							M		
Jer	R						E		
Sel							E	E	
Vir	M								
Com							M		
Gra	E						E		
Nen							M		
Chi	E					R	R		
Leb	E					E			

	PGM-97*	PGM-90*	PGM-93*	PGM-95*	PGM-98*
Gua	E	E			
Pol	M				
Bra	E		R		
Tol	E				E
Nov	M				
Cha	M				
Coy	M				
Teh1	M				
Teh2	M				
Col1	E			M	
Col2	M				
Man	M				
Ato1	E				E
Ato2				M	
Ato3				M	
Ato4	M				
Ato5	M				
Ato6	M				
Ato7	M				
Ato8	M				
Pic	M				
Que	M				
Mix1				M	
Mix2	M				
Pap1	E			E	
Pap2	M				
Gri	M				
Jer			M		
Sel			M		
Vir	E				E
Com			M		
Gra			M		
Nen			M		
Chi	M				
Leb					M

Anexos

		SOD-100*	SOD-10*	SOD-20*	SOD-90*	SOD-92*	SOD-94*	SOD-96*	SOD-102*	SOD-105*	SOD-108*	SOD-115*
Gua	M											
Pol	M											
Bra	E								E			
Tol	M											
Nov	M											
Cha	M											
Coy						R			E		R	
Teh1	M											
Teh2	M											
Col1	M											
Col2	M											
Man	M											
Ato1	M											
Ato2							M					
Ato3							M					
Ato4	E								E			
Ato5	E								E			
Ato6	E								E			
Ato7	E								E			
Ato8	E	E		R					E			
Pic	M											
Que	M											
Mix1							M					
Mix2	M											
Pap1	M											
Pap2	M											
Gri	M											
Jer			E					E				
Sel	E		E					E				
Vir												M
Com			E		R	R		E		E		
Gra			E					E				
Nen			E					E				
Chi												M
Leb											M	

Anexo 3: Secuencias de los genes de los individuos analizados de *Profundulus* que codifican para las ATPasas 6 y 8.

```

Pol ATGCCGCGAGCTCCTTCCCGCACCTTGGTTCTGCATTCTCCTATATGTCTGACTCGTCTATCTTTATTATTACCCTTAAAGTAGTAACGTATATTTATC
Gua .....C.....
Bra .....
Tol .....
Nov .....G.....
Teh1 .....
Chac .....T.....
Chac .....T.....
Gri .....G.....
Teh2 .....T.....
Teh2 .....G..T.....
Mix2 .....C..C.....
Ato5 .....T.....C..C.....
Ato6 .....T.....C..C.....
Ato8 .....A.....T.....C..C.....
Coy .....C.....C.....
Coll .....C.....C.....
Man .....C.....
Pap1 .....
Pap2 .....A.....G.....
Mix1 .....
Ato3 .....
Ato9 .....
Jer .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Sel .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Com .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..CTG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Ver .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....C..G.AC.C.GC.TC.
Ine .....A..TAAC.....C..C..A..T.TA..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Gra .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Nen .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...TCT.AACCG..A.C..T.CC.....T..G.AC.C.GC.TC.
Chi .....A..TAAC.....C..C..A..T.TG..C..TG..TCTCG...T.TA...T.T.AACCG.TA.T..T.CC.....T..G.AC.C.AC.TC.
Leb .....A..A...AA...T..C..G..A..TCTA...GG...T.TC...TG...G.TC...CATCA.CC.T...CCT...C..G.CC.CTCC.TC.
Ler .....A..A..TGA...T..C.....A..T.TAG...TG.T.TCTCA..GT.A...TCT.AAC.A..A.T..T.CT.....T..G.AC...A..T..

```

```

Pol CAAATGACAAGGACCTTCAAGCCCTATATAAAGCTAAAAAATTATACTGACTTTGACCATGATTCTAAATGATTCTAAGCTATTTTGACCAATTCTTAAG
Gua .....G.....T.....T.....T.....
Bra .....T.....T.....T.....
Tol .....C.....T.....T.....T.....C.....
Nov .....A.....T.....T.....
Teh1 .....A.....T.....T.....T.....
Chac .....C.....A.....C.....T.....T.....T.....T.....
Chac .....T.....T.....T.....T.....T.....
Gri .....A.....T.....T.....T.....T.....
Teh2 .....T.....T.....T.....T.....T.....
Teh2 .....T.....T.....T.....T.....T.....
Mix2 .....A.....CA.....T.....T.....T.....T.....
Ato5 .....A..G.....C.....CA.....T.....T.....C.....T.....
Ato6 .....A..G.....C.....CA.....T.....T.....T.....T.....
Ato8 .....A..G.....C.....CA.....T.....T.....T.....T.....
Coy .....NN.....
Coll .....
Man .....
Pap1 .....T.....C.....
Pap2 .....T.....
Mix1 .....T.....T.....T.....T.....
Ato3 .....T.....T.....T.....T.....
Ato9 .....T.....T.....T.....T.....
Jer .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T..C.....A.....
Sel .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Com .....CC..G..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Ver .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Ine .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Gra .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Nen .....CC..C..A..CA..AA.C.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Chi .....CC..C..A..CA..AAGC.A..C.AC...C.GA..CT..AAC.....CAT.....CAT.....T.....A.....
Leb .....T..C..GCCAAC.TCA...A..AA.C.A..C.CC...C.AAC.C...TCC...CAG...CAG...CT...T...TGA...
Ler .....GCC..CATC...TA.TAA.C.A..GC.AC...C.GA.CC...AAC.....CA.....CA.....CTA.....TAGT..

```


Anexos

Pol CCCCCTCTCCTAGGCATTCCATTAAATTGCTTTAGCACTTCTCCTTCCCTGAGTATTACTGCCTAAGCCCGCAAACAATGAACCTCTTAATCGCTTCTTA
 GuaG.A.....C.....
 BraA.....
 TolA.....
 Nov ..T.....A.....
 Teh1 ..T.....A.....
 ChacA.....TA..
 ChacA.....TA..
 Gri ..T.....A.....
 Teh2A.....T..
 Teh2 ..G.....A.....T..
 Mix2C.....A.T.....A.....C.T..C..
 Ato5G.....C.....A.T.....A.....C.T..C..
 Ato6C.....GA.T.....A.....C.T..C..
 Ato8C.....A.T.....A.....C.T..C..
 CoyA.....
 CollA.....
 ManA.....
 Pap1A.....C.....
 Pap2A.....
 Mix1A.....
 Ato3A.....
 Ato9A.....
 JerA.....G..T.....CC.....CC.T..C..AAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...TT.TC.ACG.TG.A.AA...C...C.T..
 SelA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 ComA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 VerA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 IneA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 GraA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.T...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 NenA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.A...C.A...T.TC..GT...TAAA...C...C.T..
 ChiA.....G..T.....CC.....CC.T..C..CAC..C..A.....A.CC..T.C...C.A...T.TC..GT...TAAAC...C...C.T..
 Leb T..TCTAT.TT.G.....C..TC...A..AA.T..C...G.A..C.A.....CCC.G..T...A...TGCTCG.GC...T.AG.GG...T.AT..
 Ler T.A..A..AT...T..C..TC.....A.T.....CAC.T.A.....A.GT.C..CC.A...T..CTG.GC...TAAA...C...C.....

Pol ACCCTTCAAAGCCGATTGTTCGCCTATTATACATATCAAATTGCATTTCCTATTAATATTCGGGACAAAAATGAGCAATAATATTTATAACCCCTAATAC
 GuaC.....C.....G.....
 BraC.....C.....A.....G.....G.....T
 TolC.....C.....A.....G.....G.....T
 NovC.....C.....A.....G.....G.....T
 Teh1C.....C.....A.....G.....G.....T
 ChacC.....C.....A.....G.....G.....T
 ChacC.....C.....A.....G.....G.....T
 GriC.....C.....C.....G.....G.....T
 Teh2C.....C.....A.....G.....G.....T
 Teh2 ..T.....C.....C.....A.....G.....G.....T
 Mix2C..T.....A.C..T.....CC.....G.....GC.G..T...T
 Ato5C..T.....A.C..T.....CCT...G.....GC.G..T...T
 Ato6C..T.....A.C..T.....CC.....G.....GC.G..T...T
 Ato8C..T.....A.C..T.....CC.....G.....GC.G..T...T
 CoyC.C.....C.....C.....AT.....T
 CollC.....C.....C.....AT.....T
 ManC.....C.....C.....AT.....T
 Pap1A.....C.C.....C.....A.....G.....GG..T...T
 Pap2C.....C..C..C.....A.....T.ATG...G.....T
 Mix1C.....A.....G.....T
 Ato3C.....A.....G.....T
 Ato9C.....A.....G.....T
 JerT...AA...T.A...A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....TT.....T..CC.CC...C.T.TT..
 SelT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....T.....T..CC.CC...C.T.TT..
 ComT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....T.....T..GCC.CC...C.T.TT..
 VerT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....T.....T..CC.CC...C.T.TT..
 IneT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....T.....T..CC.CC...C.T.TT..
 GraT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....T.....T..CC.CC...C.T.TT..
 NenT...A...T.A...C.A..G...TTC..A..CG.A.....A.....T.....T..CC.CC...C.T.TT..
 ChiT...A...T.A...C...C.A...TTC..G..CG.A.....A.....T.....TG.CC.CC...C.T.TT.G..
 Leb ..G.....A.T.....A..A..G...TC...G...TTTCAA..A...G.CAC..C...T.T.....CC..T.....CCT.....G..
 Ler ..A..C...A.T.....A..G..G...CC.A...CTTTCAA.....G...TT..C..T.....CC.CC.C..A.C.T.TT...T

Pol TATTCCTTATTACTCTAAATATATTAGGCCTCCTCCCTATACATTTACCCCAACTACCCAACATATCAGTTAACATGGCACTTGCCTTCCCTCTTTGATT
 GuaT..A.....T.....T.....A.....T.....C.....
 BraT.....T.....T.....T.....T.....C.....
 TolT.....T.....T.....T.....T.....C.....
 NovT.....T.....C.....T.....T.....T.....
 Teh1T.....T.....CG.....T.....T.....
 ChacT.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....A.....
 ChacT.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....A.....
 GriT.....T.....CG.....T.....T.....T.....T.....A.....
 Teh2T.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....
 Teh2T.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....
 Mix2C.....G.....T.....T.....C.....
 Ato5C..NA.T..G.CTTCT..CTATACA..TA.T..CTACCA..C.ACTATCAG.T.ACAT.GCAC.TG.C.T..CTC..TGA.
 Ato6C.....G.....T.....T.....T.....C.....
 Ato8C.....G.....T.....T.....T.....C.....
 CoyC.....T.....T.....T.....T.....A.....T.....T.....
 CollT.....T.....T.....T.....A.....T.....T.....
 ManT.....T.....T.....T.....A.....T.....T.....
 Pap1C.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....N.....
 Pap2C.....T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....
 Mix1T.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....
 Ato3T.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....
 Ato9T.....A..T.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....
 JerCT..T..C..G.....A.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 SelCT..T..C..G.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 ComCT..G.....C..G.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 VerCT..T..C..G.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 IneCT..T..C..G.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 GraCT..T..C..G.....A.....C.....A.....TC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 NenCT..T..C..G.....A.....C.....A.....CC..T..A..T.....G.A..A..C..C..
 ChiA.....G.T.CT..C..G.....G..T.....C.....C..C..A.....TC..T..A..T.....G.T..A..C..C..
 Leb .T..T.....G.G..C..C.....T..T..C..C.A.....T.....G.....C..C..A.....GCT.C..AG.T..C.....C..
 LerT.....T.....T.....T.....T.....T..A.....T..C..T.....CC.A..T..A..T.....AG.A..A..C..C..

Pol AGCCACTGTAATTATTGGGTTCCGAAATCAACCTACCCATGCTTTAGGTCATCTTCTTCCAGAAGGCACCCCTACCCCTTCTTATCCCTATCCTTATTATT
 GuaA.....C.....C.....
 BraC.....C.....C.....A.....C..T.....
 TolCT.....C.....C.....A.....T.....
 NovA.....C.....T.....
 Teh1A.....C.....C.....T.....
 ChacC.....C.....T.....T.....
 ChacC.....C.....T.....T.....
 GriA.....C.....T.....T.....T.....
 Teh2C.....C.....T.....T.....
 Teh2C.....C.....T.....T.....
 Mix2C.....T.....G.A.....
 Ato5TAG.CACTGT.A.TA.T..G.T.CG..ATC.A.CTA..CATGC..TA.GTCATC.TC...CAG.A.GTA..CTA..C.TC.TAT..CTGTAC.TA.TA.
 Ato6C.....T.....G.A.....
 Ato8A.....A.....T.....A.....A.....A.....
 CoyT.....C.....C.....T.....A.....A.....G.....
 CollT.....C.....C.....T.....A.....A.....A.....
 ManC.....C.....A.....T.....A.....A.....A.....
 Pap1A.....C.....C.....T.....T.....G.T.....
 Pap2A.....C.....C.....T.....C.....
 Mix1A.....C.....C.....T.....T.....C.....
 Ato3A.....C.....A.....C.....T.....T.....C.....
 Ato9A.....C.....C.....T.....T.....C.....
 Jer G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Sel G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Com G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....G.A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Ver G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Ine G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Gra G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Nen G.....A.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....GG.T..C.....
 ChiA.....C.T.....C.....C.....C.....A.....C..T.....C.....AG.T..C.....
 Leb G.....C..G.....AA.A..T.....G..T.TCT.C.....CC..C..G.....G.....A..A.CC.....AG.TT.A.....
 LerT..C.....AGCA.....C..G.....T.....A.....C..C.....T..A.....T.....T.CC.....AG.....C..C..

[illegible]

191

Anexo 4: Distancias de Nei (1972).

	Gua	Pol	Bra	Teh1	Nov	Tol	Cha	Gri	Teh2	Coy	Col1	Col2	Man	Ato1	Pic	Que	Pap1	Pap2	Ato4	Ato6	Ato5	Mix2	Ato8	Ato7	Ato3	Mix1	Jer	Sel	Com	Gra	Nen	Chi	Vir	
Pol	0.212																																	
Bra	0.196	0.179																																
Teh1	0.189	0.191	0.018																															
Nov	0.274	0.228	0.045	0.032																														
Tol	0.200	0.258	0.045	0.036	0.083																													
Cha	0.243	0.201	0.118	0.115	0.077	0.165																												
Gri	0.366	0.412	0.208	0.183	0.209	0.135	0.214																											
Teh2	0.365	0.361	0.225	0.238	0.253	0.197	0.184	0.259																										
Coy	0.430	0.459	0.239	0.266	0.293	0.304	0.364	0.488	0.409																									
Col1	0.370	0.378	0.185	0.205	0.230	0.227	0.296	0.415	0.317	0.165																								
Col2	0.434	0.441	0.240	0.258	0.281	0.240	0.342	0.402	0.269	0.199	0.040																							
Man	0.339	0.368	0.138	0.133	0.178	0.140	0.285	0.299	0.286	0.197	0.107	0.160																						
Ato1	0.382	0.417	0.225	0.236	0.295	0.195	0.325	0.330	0.226	0.203	0.143	0.071	0.147																					
Pic	0.483	0.484	0.239	0.238	0.249	0.191	0.373	0.345	0.234	0.382	0.216	0.141	0.239	0.197																				
Que	0.370	0.390	0.156	0.150	0.148	0.114	0.249	0.233	0.207	0.317	0.185	0.149	0.216	0.233	0.076																			
Pap1	0.386	0.457	0.245	0.262	0.271	0.291	0.366	0.536	0.402	0.246	0.210	0.198	0.355	0.278	0.206	0.230																		
Pap2	0.292	0.318	0.146	0.155	0.163	0.190	0.248	0.404	0.338	0.185	0.139	0.159	0.283	0.266	0.244	0.143	0.074																	
Ato4	0.378	0.317	0.291	0.279	0.286	0.369	0.252	0.478	0.491	0.497	0.426	0.509	0.418	0.514	0.576	0.522	0.543	0.435																
Ato6	0.324	0.273	0.243	0.245	0.275	0.302	0.241	0.395	0.397	0.426	0.392	0.442	0.385	0.440	0.476	0.433	0.504	0.389	0.061															
Ato5	0.378	0.309	0.277	0.279	0.305	0.326	0.265	0.402	0.406	0.419	0.420	0.453	0.412	0.449	0.485	0.446	0.556	0.429	0.069	0.010														
Mix2	0.389	0.328	0.312	0.303	0.341	0.383	0.320	0.494	0.504	0.507	0.440	0.523	0.426	0.522	0.587	0.511	0.541	0.422	0.107	0.054	0.077													
Ato8	0.344	0.314	0.203	0.187	0.217	0.252	0.283	0.383	0.452	0.385	0.311	0.385	0.298	0.411	0.416	0.366	0.408	0.304	0.080	0.058	0.068	0.088												
Ato7	0.380	0.393	0.334	0.367	0.416	0.435	0.384	0.568	0.559	0.458	0.506	0.587	0.478	0.591	0.654	0.600	0.619	0.515	0.152	0.069	0.076	0.136	0.140											
Ato2	0.829	0.839	0.562	0.587	0.616	0.512	0.588	0.526	0.403	0.507	0.430	0.381	0.459	0.385	0.373	0.452	0.566	0.642	0.919	0.777	0.745	0.865	0.738	0.905										
Ato3	0.656	0.673	0.455	0.470	0.520	0.410	0.475	0.424	0.354	0.480	0.435	0.413	0.410	0.366	0.425	0.470	0.552	0.600	0.742	0.624	0.598	0.685	0.601	0.736	0.051									
Mix1	0.684	0.754	0.490	0.500	0.541	0.445	0.511	0.454	0.434	0.494	0.393	0.390	0.423	0.402	0.417	0.468	0.499	0.559	0.829	0.722	0.705	0.856	0.644	0.837	0.041	0.085								
Jer	1.190	1.129	1.230	1.252	1.238	1.254	1.386	1.319	1.554	1.905	1.581	1.582	1.415	1.630	1.396	1.335	1.717	1.618	1.322	1.182	1.165	1.221	1.127	1.166	1.523	1.419	1.515							
Sel	1.242	1.167	1.253	1.276	1.254	1.289	1.418	1.373	1.575	1.929	1.586	1.582	1.423	1.648	1.411	1.355	1.714	1.617	1.347	1.211	1.197	1.256	1.147	1.117	1.570	1.470	1.562	0.103						
Com	1.379	1.272	1.389	1.435	1.417	1.431	1.635	1.556	1.529	1.874	1.554	1.549	1.365	1.623	1.357	1.390	1.907	1.841	1.606	1.421	1.405	1.491	1.346	1.310	1.553	1.562	1.642	0.116	0.100					
Gra	1.226	1.146	1.255	1.291	1.278	1.293	1.417	1.358	1.589	1.955	1.622	1.623	1.442	1.677	1.439	1.377	1.761	1.660	1.341	1.201	1.184	1.252	1.146	1.100	1.578	1.471	1.550	0.133	0.102	0.122				
Nen	1.200	1.101	1.150	1.185	1.169	1.196	1.347	1.296	1.497	1.799	1.495	1.496	1.322	1.563	1.319	1.267	1.629	1.529	1.311	1.167	1.154	1.222	1.102	1.133	1.469	1.374	1.461	0.069	0.151	0.156	0.055			
Chi	0.877	1.007	1.234	1.256	1.284	1.297	1.130	1.340	1.131	1.128	1.223	1.177	1.213	1.144	1.320	1.234	1.209	1.168	1.434	1.254	1.266	1.424	1.364	1.180	1.582	1.555	1.454	0.799	0.711	0.557	0.679	0.775		
Vir	0.613	0.878	1.032	1.032	1.154	0.957	0.968	1.043	0.885	1.076	0.973	0.956	0.964	0.912	1.049	1.014	1.114	1.080	1.293	1.128	1.138	1.334	1.202	1.110	1.205	1.167	1.065	0.641	0.663	0.509	0.625	0.654	0.171	
leb	2.326	1.895	2.790	2.815	2.824	2.591	2.319	2.794	2.455	2.785	2.758	2.823	2.861	2.757	2.401	2.794	2.201	2.677	2.457	2.069	2.052	2.063	2.309	1.872	2.343	2.183	2.335	2.378	2.024	2.091	2.060	2.483	1.633	2.090

Anexo 5: Distancias de Rogers (1972).

	Gua	Pol	Bra	Teh1	Nov	Tol	Cha	Gri	Teh2	Coy	Col1	Col2	Man	Ato1	Pic	Que	Pap1	Pap2	Ato4	Ato6	Mix2	Ato8	Ato7	Ato2	Ato3	Mix1	Jer	Sel	Com	Gra	Nen	Chi	Vir	
Pol	0.215																																	
Bra	0.219	0.199																																
Teh1	0.207	0.200	0.074																															
Nov	0.272	0.230	0.111	0.089																														
Tol	0.217	0.261	0.112	0.096	0.144																													
Cha	0.248	0.203	0.155	0.146	0.116	0.186																												
Gri	0.337	0.354	0.234	0.213	0.225	0.173	0.229																											
Teh2	0.335	0.320	0.244	0.255	0.260	0.225	0.198	0.266																										
Coy	0.371	0.383	0.243	0.260	0.281	0.299	0.320	0.406	0.360																									
Col1	0.338	0.336	0.217	0.228	0.254	0.249	0.288	0.370	0.296	0.200																								
Col2	0.389	0.384	0.268	0.277	0.300	0.251	0.322	0.359	0.268	0.218	0.094																							
Man	0.325	0.333	0.191	0.173	0.221	0.181	0.275	0.299	0.279	0.222	0.137	0.194																						
Ato1	0.356	0.376	0.264	0.262	0.310	0.214	0.308	0.316	0.250	0.228	0.208	0.126	0.200																					
Pic	0.405	0.398	0.258	0.254	0.257	0.217	0.335	0.304	0.229	0.347	0.232	0.178	0.253	0.230																				
Que	0.354	0.360	0.221	0.205	0.197	0.179	0.262	0.257	0.239	0.315	0.233	0.207	0.252	0.268	0.142																			
Pap1	0.348	0.399	0.266	0.283	0.294	0.306	0.348	0.438	0.360	0.266	0.233	0.230	0.341	0.306	0.222	0.273																		
Pap2	0.274	0.286	0.183	0.178	0.190	0.216	0.250	0.358	0.309	0.209	0.164	0.194	0.285	0.289	0.245	0.193	0.129																	
Ato4	0.340	0.290	0.274	0.276	0.286	0.345	0.257	0.401	0.410	0.410	0.373	0.426	0.375	0.438	0.456	0.451	0.444	0.370																
Ato6	0.317	0.273	0.249	0.265	0.295	0.300	0.257	0.357	0.365	0.374	0.361	0.384	0.363	0.395	0.411	0.408	0.434	0.354	0.105															
Ato5	0.349	0.291	0.277	0.280	0.307	0.299	0.269	0.355	0.363	0.365	0.374	0.380	0.376	0.392	0.410	0.406	0.465	0.371	0.110	0.045														
Mix2	0.347	0.302	0.310	0.294	0.320	0.361	0.310	0.418	0.422	0.417	0.385	0.438	0.378	0.443	0.465	0.429	0.453	0.364	0.149	0.123	0.134													
Ato8	0.341	0.321	0.234	0.226	0.250	0.298	0.303	0.370	0.409	0.350	0.321	0.376	0.324	0.387	0.392	0.377	0.389	0.312	0.148	0.143	0.146	0.158												
Ato7	0.358	0.346	0.320	0.343	0.381	0.394	0.348	0.456	0.458	0.394	0.431	0.474	0.410	0.482	0.504	0.491	0.495	0.428	0.186	0.122	0.122	0.178	0.209											
Ato2	0.582	0.583	0.456	0.483	0.483	0.436	0.473	0.439	0.360	0.422	0.375	0.351	0.402	0.367	0.340	0.391	0.462	0.492	0.609	0.553	0.544	0.590	0.554	0.613										
Ato3	0.507	0.510	0.401	0.408	0.444	0.373	0.412	0.377	0.335	0.409	0.373	0.364	0.369	0.352	0.384	0.391	0.446	0.459	0.546	0.489	0.471	0.512	0.493	0.548	0.094									
Mix1	0.518	0.545	0.422	0.425	0.450	0.385	0.420	0.397	0.382	0.416	0.354	0.339	0.363	0.345	0.377	0.390	0.424	0.453	0.585	0.528	0.511	0.594	0.514	0.588	0.100	0.126								
Jer	0.697	0.683	0.692	0.701	0.704	0.705	0.734	0.726	0.774	0.823	0.770	0.769	0.735	0.782	0.745	0.723	0.800	0.788	0.728	0.685	0.678	0.703	0.661	0.675	0.770	0.740	0.768							
Sel	0.712	0.692	0.704	0.715	0.709	0.719	0.749	0.740	0.779	0.838	0.778	0.777	0.748	0.794	0.750	0.737	0.808	0.790	0.734	0.690	0.684	0.711	0.672	0.667	0.779	0.759	0.784	0.128						
Com	0.738	0.715	0.726	0.740	0.737	0.741	0.779	0.765	0.762	0.814	0.760	0.757	0.721	0.774	0.728	0.726	0.818	0.814	0.783	0.729	0.731	0.761	0.715	0.713	0.765	0.761	0.781	0.165	0.135					
Gra	0.708	0.690	0.697	0.708	0.714	0.715	0.741	0.735	0.782	0.831	0.778	0.777	0.743	0.790	0.755	0.733	0.808	0.795	0.734	0.690	0.683	0.712	0.668	0.664	0.781	0.750	0.775	0.164	0.127	0.153				
Nen	0.700	0.667	0.673	0.686	0.677	0.686	0.723	0.709	0.753	0.808	0.752	0.749	0.715	0.767	0.718	0.705	0.781	0.763	0.718	0.666	0.667	0.696	0.659	0.661	0.750	0.730	0.754	0.137	0.183	0.193	0.119			
Chi	0.594	0.642	0.697	0.701	0.710	0.723	0.670	0.731	0.671	0.672	0.699	0.682	0.693	0.678	0.733	0.699	0.701	0.682	0.758	0.704	0.708	0.752	0.724	0.690	0.787	0.779	0.752	0.562	0.523	0.446	0.501	0.558		
Vir	0.466	0.590	0.643	0.644	0.675	0.616	0.623	0.651	0.591	0.660	0.618	0.613	0.613	0.597	0.652	0.623	0.669	0.656	0.722	0.667	0.672	0.724	0.685	0.662	0.696	0.687	0.649	0.495	0.501	0.422	0.483	0.507	0.216	
ab	0.879	0.839	0.896	0.898	0.904	0.894	0.876	0.908	0.879	0.904	0.897	0.897	0.899	0.892	0.878	0.890	0.862	0.902	0.904	0.850	0.854	0.859	0.856	0.834	0.873	0.856	0.869	0.879	0.848	0.843	0.848	0.876	0.780	0.848

Anexo 6: Distancias de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

	Gua	Pol	Bra	Teh1	Nov	Tol	Cha	Gri	Teh2	Coy	Col1	Col2	Man	Ato1	Pic	Que	Pap1	Pap2	Ato4	Ato6	Ato5	Mix2	Ato8	Ato7	Ato2	Ato3	Mix1	Jer	Sel	Com	Gra	Nen	Chi	Vir	
Pol	0.392																																		
Bra	0.393	0.378																																	
Teh1	0.385	0.406	0.200																																
Nov	0.437	0.419	0.231	0.192																															
Tol	0.385	0.433	0.225	0.205	0.270																														
Cha	0.412	0.394	0.330	0.315	0.263	0.351																													
Gri	0.495	0.520	0.399	0.380	0.406	0.318	0.383																												
Teh2	0.497	0.503	0.425	0.424	0.422	0.388	0.365	0.427																											
Coy	0.528	0.550	0.411	0.443	0.452	0.458	0.489	0.549	0.530																										
Col1	0.496	0.512	0.379	0.406	0.410	0.409	0.455	0.513	0.493	0.344																									
Col2	0.519	0.535	0.420	0.434	0.435	0.404	0.468	0.503	0.460	0.373	0.183																								
Man	0.481	0.509	0.352	0.344	0.380	0.338	0.455	0.453	0.467	0.384	0.291	0.340																							
Ato1	0.488	0.507	0.393	0.406	0.432	0.353	0.448	0.460	0.431	0.381	0.303	0.233	0.322																						
Pic	0.546	0.552	0.419	0.417	0.409	0.374	0.488	0.478	0.424	0.489	0.411	0.339	0.422	0.387																					
Que	0.487	0.509	0.352	0.342	0.332	0.302	0.412	0.422	0.422	0.447	0.383	0.338	0.399	0.394	0.262																				
Pap1	0.516	0.548	0.435	0.447	0.443	0.454	0.493	0.564	0.541	0.417	0.404	0.393	0.501	0.430	0.383	0.401																			
Pap2	0.471	0.487	0.356	0.380	0.369	0.391	0.433	0.517	0.503	0.369	0.336	0.349	0.463	0.421	0.414	0.339	0.264																		
Ato4	0.501	0.470	0.462	0.456	0.452	0.498	0.426	0.540	0.562	0.560	0.534	0.570	0.531	0.557	0.583	0.558	0.580	0.546																	
Ato6	0.475	0.446	0.436	0.440	0.442	0.457	0.411	0.499	0.515	0.538	0.527	0.541	0.524	0.524	0.539	0.519	0.562	0.525	0.205																
Ato5	0.503	0.471	0.457	0.463	0.463	0.475	0.430	0.508	0.526	0.537	0.534	0.548	0.531	0.532	0.549	0.531	0.583	0.546	0.213	0.106															
Mix2	0.506	0.475	0.483	0.480	0.490	0.503	0.471	0.544	0.565	0.579	0.538	0.574	0.534	0.556	0.586	0.555	0.579	0.543	0.279	0.240	0.256														
Ato8	0.489	0.476	0.406	0.396	0.405	0.437	0.452	0.507	0.538	0.522	0.482	0.520	0.472	0.518	0.512	0.485	0.525	0.489	0.284	0.271	0.272	0.294													
Ato7	0.490	0.507	0.484	0.502	0.515	0.515	0.498	0.570	0.572	0.547	0.557	0.584	0.551	0.569	0.595	0.573	0.597	0.569	0.330	0.255	0.260	0.327	0.344												
Ato2	0.658	0.666	0.585	0.580	0.599	0.558	0.582	0.560	0.519	0.566	0.536	0.520	0.545	0.505	0.508	0.544	0.578	0.614	0.679	0.649	0.644	0.665	0.634	0.664											
Ato3	0.603	0.620	0.546	0.537	0.565	0.516	0.530	0.518	0.496	0.549	0.520	0.521	0.521	0.487	0.528	0.542	0.561	0.583	0.637	0.608	0.601	0.617	0.595	0.620	0.198										
Mix1	0.621	0.649	0.560	0.549	0.578	0.531	0.555	0.532	0.541	0.558	0.514	0.511	0.529	0.507	0.523	0.537	0.545	0.584	0.665	0.642	0.637	0.666	0.614	0.657	0.200	0.256									
Jer	0.735	0.720	0.748	0.757	0.759	0.756	0.772	0.762	0.791	0.825	0.798	0.802	0.781	0.787	0.780	0.763	0.808	0.804	0.762	0.750	0.748	0.746	0.733	0.748	0.786	0.774	0.785								
Sel	0.750	0.730	0.754	0.762	0.760	0.763	0.782	0.772	0.797	0.830	0.797	0.799	0.794	0.789	0.781	0.770	0.806	0.800	0.769	0.758	0.757	0.760	0.739	0.743	0.800	0.793	0.798	0.303							
Com	0.773	0.753	0.774	0.787	0.788	0.786	0.812	0.803	0.795	0.827	0.803	0.802	0.781	0.799	0.778	0.784	0.829	0.826	0.803	0.792	0.790	0.795	0.766	0.770	0.802	0.804	0.808	0.307	0.314						
Gra	0.743	0.726	0.755	0.766	0.768	0.765	0.779	0.771	0.798	0.834	0.807	0.810	0.788	0.800	0.789	0.775	0.817	0.813	0.764	0.752	0.749	0.755	0.737	0.732	0.801	0.789	0.793	0.317	0.304	0.320					
Nen	0.741	0.717	0.733	0.750	0.749	0.751	0.774	0.765	0.790	0.818	0.790	0.794	0.772	0.785	0.770	0.760	0.801	0.794	0.768	0.756	0.754	0.759	0.732	0.745	0.785	0.777	0.763	0.270	0.350	0.339	0.229				
Chi	0.671	0.689	0.736	0.746	0.751	0.745	0.733	0.760	0.729	0.726	0.737	0.734	0.735	0.729	0.749	0.738	0.744	0.735	0.762	0.749	0.749	0.762	0.750	0.721	0.788	0.779	0.778	0.663	0.644	0.569	0.627	0.646			
Vir	0.618	0.684	0.722	0.719	0.742	0.701	0.711	0.726	0.698	0.726	0.712	0.708	0.702	0.691	0.724	0.714	0.732	0.733	0.762	0.748	0.748	0.766	0.746	0.725	0.754	0.739	0.732	0.611	0.632	0.574	0.611	0.618	0.336		
ab	0.851	0.821	0.867	0.870	0.870	0.858	0.851	0.864	0.856	0.865	0.864	0.867	0.872	0.862	0.855	0.870	0.839	0.861	0.837	0.825	0.824	0.824	0.832	0.808	0.858	0.841	0.858	0.843	0.833	0.829	0.834	0.851	0.801	0.826	

Anexo 7: Distancias absolutas.

Lab	Ler	Mix1	Ato3	Ato9	Cha	Cha	Teh2	Teh2	Col1	Coy	Man	Pap1	Pap2	Pol	Gua	Tol	Bra	Teh1	Nov	Gri	Ato1	Mix2	Ato8	Chi	Gra	Nen	Chi	Ver	Jer	Sel	Com		
	220	280	238																														
		280	239	3																													
		280	238	2	3																												
		282	238	14	15	14																											
		283	239	15	16	15	1																										
		281	237	13	14	13	1	2																									
		283	240	17	18	17	5	6	4																								
		286	240	36	37	36	34	35	33	37																							
		226	200	34	34	33	33	33	32	35	8																						
		289	245	39	40	39	37	38	36	40	9	16																					
		290	240	37	38	37	35	36	34	38	32	32	34																				
		292	248	37	38	37	35	36	34	38	32	31	36	37																			
		279	245	37	38	37	37	38	36	40	24	26	27	37	38																		
		287	253	44	45	44	44	45	43	47	35	34	38	44	41	27																	
		281	243	31	32	31	29	30	28	32	28	26	31	30	31	30	35																
		285	244	30	31	30	28	29	27	31	27	26	30	31	29	29	33	10															
		281	244	24	25	24	24	25	23	27	30	29	33	34	35	30	34	26	24														
		279	243	21	22	21	21	22	20	24	27	26	30	31	32	27	33	23	21	5													
		282	248	26	27	26	26	27	25	29	30	29	33	36	35	33	37	28	26	10	9												
		285	251	66	67	66	59	60	59	63	71	62	74	70	77	62	70	70	69	65	62	65											
		284	249	63	64	63	56	57	56	60	68	60	71	67	74	59	69	67	66	62	59	62	3										
		291	255	72	73	72	63	64	63	67	75	66	74	74	81	66	74	74	73	69	66	68	10	9									
		285	251	66	67	66	59	60	59	63	71	62	74	70	77	62	70	70	69	65	62	65	2	3	10								
		240	174	222	223	220	219	220	218	221	226	185	231	231	224	225	233	224	222	228	227	232	229	227	234	229							
		228	165	217	218	217	214	215	213	216	215	179	222	219	218	213	221	212	212	219	218	222	219	217	224	219	47						
		228	166	215	216	215	212	213	211	214	214	180	219	217	218	213	221	212	210	217	216	221	218	216	223	218	45	7					
		227	164	215	216	215	212	213	211	214	213	178	220	217	216	211	219	210	210	217	216	220	217	215	222	217	48	3	8				
		228	169	218	219	218	217	218	216	219	216	181	223	218	221	210	220	213	213	218	217	221	218	216	223	218	49	6	11	7			
		238	179	226	227	226	223	224	222	225	224	187	229	228	227	222	231	221	221	228	227	231	228	226	233	228	59	17	20	18	21		
		228	165	217	218	217	214	215	213	216	215	179	220	219	218	213	221	212	212	219	218	222	219	217	224	219	45	2	5	3	6	15	
		230	172	221	222	221	218	219	217	220	218	181	223	222	221	216	224	215	215	223	222	226	222	220	227	222	53	10	13	11	14	23	8

Anexo 8: Distancias no corregidas.

	Leb	Ler	Mix1	Ato3	Ato1	Chaca	Chaca	Teh2	Teh2	Col1	Coy	Man	Pap1	Pap2	Pol	Gua	Tol	Bra	Teh1	Nov	Gri	Ato6	Mix2	Ato8	Ato5	Chi	Gra	Nen	Ine	Ver	Jer	Sel	
Ler		0.259																															
Mix1		0.329	0.280																														
Ato3		0.329	0.281	0.004																													
Ato9		0.329	0.280	0.002	0.004																												
Chaca		0.332	0.280	0.016	0.018	0.016																											
Chaca		0.333	0.281	0.018	0.019	0.018	0.001																										
Teh2		0.331	0.279	0.015	0.016	0.015	0.001	0.002																									
Teh2		0.333	0.282	0.020	0.021	0.020	0.006	0.007	0.005																								
Col1		0.336	0.282	0.042	0.044	0.042	0.040	0.041	0.039	0.044																							
Coy		0.346	0.306	0.052	0.052	0.051	0.051	0.051	0.049	0.054	0.012																						
Man		0.340	0.288	0.046	0.047	0.046	0.044	0.045	0.042	0.047	0.011	0.025																					
Pap1		0.342	0.283	0.044	0.045	0.044	0.041	0.042	0.040	0.045	0.038	0.049	0.040																				
Pap2		0.344	0.292	0.044	0.045	0.044	0.041	0.042	0.040	0.045	0.038	0.048	0.042	0.044																			
Pol		0.328	0.288	0.044	0.045	0.044	0.044	0.045	0.042	0.047	0.028	0.040	0.032	0.044	0.045																		
Gua		0.338	0.298	0.052	0.053	0.052	0.052	0.053	0.051	0.055	0.041	0.052	0.045	0.052	0.048	0.032																	
Tol		0.331	0.286	0.036	0.038	0.036	0.034	0.035	0.033	0.038	0.033	0.040	0.036	0.035	0.036	0.035	0.041																
Bra		0.335	0.287	0.035	0.036	0.035	0.033	0.034	0.032	0.036	0.032	0.040	0.035	0.037	0.034	0.034	0.039	0.012															
Teh1		0.331	0.287	0.028	0.029	0.028	0.028	0.029	0.027	0.032	0.035	0.045	0.039	0.040	0.041	0.035	0.040	0.031	0.028														
Nov		0.328	0.286	0.025	0.026	0.025	0.025	0.026	0.024	0.028	0.032	0.040	0.035	0.037	0.038	0.032	0.039	0.027	0.025	0.006													
Gri		0.332	0.292	0.031	0.032	0.031	0.031	0.032	0.029	0.034	0.035	0.045	0.039	0.042	0.041	0.039	0.044	0.033	0.031	0.012	0.011												
Ato6		0.335	0.295	0.078	0.079	0.078	0.069	0.071	0.069	0.074	0.084	0.095	0.087	0.082	0.091	0.073	0.082	0.082	0.081	0.076	0.073	0.076											
Mix2		0.334	0.293	0.074	0.075	0.074	0.066	0.067	0.066	0.071	0.080	0.092	0.084	0.079	0.087	0.069	0.081	0.079	0.078	0.073	0.069	0.073	0.004										
Ato8		0.342	0.300	0.085	0.086	0.085	0.074	0.075	0.074	0.079	0.088	0.101	0.087	0.087	0.095	0.078	0.087	0.087	0.086	0.081	0.078	0.080	0.012	0.011									
Ato5		0.335	0.295	0.078	0.079	0.078	0.069	0.071	0.069	0.074	0.084	0.095	0.087	0.082	0.091	0.073	0.082	0.082	0.081	0.076	0.073	0.076	0.002	0.004	0.012								
Chi		0.282	0.205	0.261	0.262	0.259	0.258	0.259	0.256	0.260	0.266	0.283	0.272	0.272	0.264	0.265	0.274	0.264	0.261	0.268	0.267	0.273	0.269	0.267	0.275	0.269							
Gra		0.268	0.194	0.255	0.256	0.255	0.252	0.253	0.251	0.254	0.253	0.274	0.261	0.258	0.256	0.251	0.260	0.249	0.249	0.258	0.256	0.261	0.258	0.255	0.264	0.258	0.055						
Nen		0.268	0.195	0.253	0.254	0.253	0.249	0.251	0.248	0.252	0.252	0.275	0.258	0.256	0.256	0.251	0.260	0.249	0.247	0.255	0.254	0.260	0.256	0.254	0.262	0.256	0.053	0.008					
Ine		0.267	0.193	0.253	0.254	0.253	0.249	0.251	0.248	0.252	0.251	0.272	0.259	0.256	0.254	0.248	0.258	0.247	0.247	0.255	0.254	0.259	0.255	0.253	0.261	0.255	0.056	0.004	0.009				
Ver		0.268	0.199	0.256	0.258	0.256	0.255	0.256	0.254	0.258	0.254	0.277	0.262	0.257	0.260	0.247	0.259	0.251	0.251	0.256	0.255	0.260	0.256	0.254	0.262	0.256	0.058	0.007	0.013	0.008			
Jer		0.280	0.211	0.266	0.267	0.266	0.262	0.264	0.261	0.265	0.264	0.286	0.269	0.269	0.267	0.261	0.272	0.260	0.260	0.268	0.267	0.272	0.268	0.266	0.274	0.268	0.069	0.020	0.024	0.021	0.025		
Sel		0.268	0.194	0.255	0.256	0.255	0.252	0.253	0.251	0.254	0.253	0.274	0.259	0.258	0.256	0.251	0.260	0.249	0.249	0.258	0.256	0.261	0.258	0.255	0.264	0.258	0.053	0.002	0.006	0.004	0.007	0.018	
Com		0.271	0.202	0.260	0.261	0.260	0.256	0.258	0.255	0.259	0.256	0.277	0.262	0.261	0.260	0.254	0.264	0.253	0.253	0.262	0.261	0.266	0.261	0.259	0.267	0.261	0.062	0.012	0.015	0.013	0.016	0.027	0.009

Anexo 9: Resultados obtenidos de la aplicación del programa DIVA.

profalor.txt opened as output file

optimization successful - exact solution

settings: maxareas=12, bound=250, hold=32767, weight=1.000, age=1.000

optimal reconstruction requires 9 dispersals

optimal distributions at each node:

node 21 (anc. of terminals toliman-quetzala): DE

node 22 (anc. of terminals toliman-grijalva): DEF

node 23 (anc. of terminals colotepec1-papagayo1): GH

node 24 (anc. of terminals colotepec1-atoyac1): GHI

node 25 (anc. of terminals atoyac2-mixteco1): IJ

node 26 (anc. of terminals colotepec1-mixteco1): GHJ GHJ

node 27 (anc. of terminals toliman-mixteco1): DEGHJ DEFGHJ DEGHJ DEFGHJ

node 28 (anc. of terminals tehuantepec1-mixteco1): CDEGHJ CDEFGHJ CDEGHJ

CDEFGHJ

node 29 (anc. of terminals bravo-mixteco1): BDEGHJ BCDEGHJ BDEFGHJ BCDEFGHJ

BDEGHJ BCDEGHJ BDEFGHJ BCDEFGHJ

node 30 (anc. of terminals atoyac5-atoyac7): I

node 31 (anc. of terminals tehuantepec2-atoyac7): CI

node 32 (anc. of terminals bravo-atoyac7): BCDEGHJ BCDEFGHJ

node 33 (anc. of terminals bravo-polochic): BCDEGHJ BCDEFGHJ

node 34 (anc. of terminals guacalate-polochic): ABCDEGHJ ABCDEFGHJ

node 35 (anc. of terminals jeronimo-nenton): F

node 36 (anc. of terminals jeronimo-comalatengo): F

node 37 (anc. of terminals guacalate-comalatengo): ABCDEFGHJ

node 38 (anc. of terminals guacalate-chiapas): ABCDEFGHJ

node 39 (anc. of terminals guacalate-lebrija): ABCDEFGHJ

there are 70 alternative, equally optimal reconstructions

results added to counters



Agradecimientos

En 1994, un año después de finalizar mis estudios de biología, fui becado en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid para empezar a trabajar con peces de agua dulce. Laboralmente, era la mejor oportunidad que se me presentó para lo que siempre había querido, trabajar en temas relacionados con ecosistemas acuáticos continentales. Mis comienzos fueron estudiando la biología y la ecología de dos especies de peces, autóctonos y protegidos en nuestro país, pertenecientes al orden de los ciprinodontiformes. Estos comienzos fueron duros, lo sabe aquella gente que estuvo a mi lado, mi primer agradecimiento para ellos.

Por entonces, Nacho, mi actual director de tesis, me ofreció la oportunidad de trabajar en taxonomía y sistemática de peces tropicales. Un reto para mí. Sopesé pros y contras, y teniendo en cuenta las circunstancias laborales en las que me encontraba, decidí aceptar el reto. Una decisión que iba a cambiar mi vida, además de profesionalmente, de manera personal. Gracias, Nacho. Me fui a Panamá. Una nueva experiencia para mí, nuevos conocimientos, y una nueva gente a la que agradecer. Gracias Anabel, gracias por todo el apoyo que me mostraste en América, por ser mi amiga y por enseñarme el buen saber hacer en el mundo de la ictiología. Durante mi estancia en América, tuve la suerte de compartir trabajo de campo en Guatemala con Nacho y su mujer, Paloma, y fue mi primera aproximación a *Profundulus*, objeto de esta tesis. Por motivos sociopolíticos, no pude alcanzar los objetivos de mi proyecto en Panamá. Tuve que volver. Nacho confió en mí para ofrecerme el material y los conocimientos y comenzar este estudio que aquí presento. Gracias de nuevo, Nacho. Y gracias a aquella gente que hizo posible la recogida del material que trabajé, allá en México y Guatemala, Adolfo, María, Paloma Garzón, Nacho, José Luis y Emilio.

Enfrentarme con todo este material y esta teoría no fue fácil, mucha gente me apoyó en esos momentos. Gracias José por esas horas que me dedicaste en el laboratorio, y por guiarme en un principio; gracias Emilio, por acompañarme en el laboratorio y por esas chelas de verano; gracias Toñi, por esas “collejas”; gracias, Lourdes, que siempre estabas ahí. Cómo no, Jaime y Susi, por discutir de lo científico, de lo divino y de lo humano. Gracias, Jesús, por darme la oportunidad de trabajar en las colecciones de ictiología. Grito gracias con cariño a mis grandes apoyos intelectuales, Annie y David, grito con cariño porque tengo la suerte de tenerlos como amigos. Gracias Rafa, que has estado ahí cuando he tenido alguna duda que consultar. Gracias Paloma, un fuerte apoyo en los momentos difíciles. Para no olvidarme a nadie, gracias a mis compañeros del museo, es grato trabajar con vosotros.

Finalmente, gracias a mi gente, a mi familia y amigos, siempre incondicionales. Gracias Nico, Angelita, Miguel, Gema, César, Lidia, etc. A mi primo Pedro, un beso y un abrazo donde estés, te guardo dentro. Reivindico el derecho a equivocarnos. Gracias a la peña del barrio, una piña: Venga, ¡que ya comenzamos a ser más!, y aunque estemos lejos, estamos cerca. A los compis de la carrera. Gracias Marga. Gracias a mi gente más íntima.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Compulsada la presente copia con-
cuerda fielmente con el original a que se
refiere.

Madrid,

EL FUNCIONARIO

Reunido el tribunal que suscribe en el día
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis
doctoral con SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"

MADRID, 31 de Mayo de 2004

UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE
MADRID
BIBLIOTECA
CIENCIAS